

# ***Cronobacter* spp. riskibakteereina äidinmaidonkorvikkeissa**

Iida Autio

Eläinlääketieteen lisensiaatintutkielma

Elintarvikehygienia

Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin Yliopisto

2020



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto	
Tekijä - Författare – Author Iida Autio			
Työn nimi - Arbetets titel – Title <i>Cronobacter</i> spp. riskibakteereina äidinmaidonkorvikkeissa			
Oppiaine - Läroämne – Subject Elintarvikehygienia			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatintutkielma	Aika - Datum – Month and year Maaliskuu 2020	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 40	
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p><i>Cronobacter</i> spp. eli kronobakteerit voivat aiheuttaa vakavia sairauksia vastasyntyneille, vanhuksille ja immuunipuutteisille aikuisille. Maailmalla on raportoitu useita kronobakteerien aiheuttamia taudinpurkauksia, joissa vastasyntyneiden infektiot on yhdistetty jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen käyttöön. Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on koota tietoa kronobakteereista sekä syventyä niiden aiheuttamiin elintarvikehygieenisiin riskeihin, erityisesti jauhemaisissa äidinmaidonkorvikkeissa.</p> <p>Kronobakteerit ovat gramnegatiivisia sauvoja, jotka säilyvät pitkiä aikoja kuivissa olosuhteissa ja pystyvät muodostamaan biofilmejä erilaisille pinnoille. Kronobakteerien todennäköisin reservuaari on kasvimateriaali, mutta kronobakteereita on eristetty monista elintarvikkeista sekä ympäristönäytteistä. Kaikkia kronobakteerisuvun bakteereita pidetään tällä hetkellä opportunistisina patogeeneina. Kronobakteerit voivat aiheuttaa vastasyntyneille muun muassa kuolioista suolistotulehdusta, verenmyrkytystä sekä aivokalvontulehdusta. Kuolleisuus kronobakteeri-infektioissa on vastasyntyneillä ja pikkulapsilla keskimäärin 26,9 %.</p> <p>Jauhemaisia äidinmaidonkorvikkeita valmistavien elintarvikelaitosten riskienhallinta perustuu mahdollisten kronobakteerilähteiden tuntemiseen koko tuotteen valmistusprosessin ja elinkaaren osalta. Kronobakteerit eivät selviä pastöroinnista, joten lopputuotteen bakteerit ovat peräisin joko tuotantoympäristöstä kontaminaationa, korvikkeeseen tehtaassa lisättävistä ainesosista, jotka eivät kestä kuumennusta, tai äidinmaitokorvikkeen sekoituksesta kotona. WHO on luonut äidinmaidonkorvikkeiden käyttöön tarkat ohjeistukset, jotka korostavat yli 70 °C veden käyttöä jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen valmistuksessa kronobakteeririskin pienentämiseksi.</p> <p>Kronobakteeririskin pienentämisessä ovat avainasemassa turvalliset äidinmaidonkorvikkeet, kuluttajien neuvonta turvalliseen äidinmaidonkorvikkeiden käyttöön sekä riskiryhmien kanssa työskentelevien ammattihenkilökunnan koulutus.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Cronobacter</i> spp. <i>Cronobacter sakazakii</i> , kronobakteeri, jauhemainen äidinmaidonkorvike			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktör och ledare – Director and Supervisor(s) Työnjohtaja Elina Säde Ohjaajat Elina Säde ja Riikka Keto-Timonen			

# SISÄLLYS

1. JOHDANTO.....	1
2. <i>Cronobacter</i> spp.....	2
2.1 Kasvuolosuhteet ja kasvua rajoittavat tekijät .....	3
2.2 Reservuaarit .....	3
2.3 Patogeenisuus ja virulenssitekijät .....	4
3. Kronobakteerien kliininen merkitys .....	4
3.1 Kronobakteerien aiheuttamat taudinpurkaukset .....	5
3.2 Vastasyntyneet ja pikkulapset .....	6
3.2.1 Aivokalvontulehdus ja verenmyrkytys .....	6
3.2.2 Nekrotisoiva enterokoliitti .....	7
3.3 Vanhukset ja muut immuunipuutteiset .....	7
4. Kronobakteerien osoittaminen elintarvikkeista.....	8
4.1 ISO 22964:2017 –standardi .....	9
4.1.1 CS-rikastusliemi.....	9
4.1.2 CCI-malja.....	10
4.1.3 Kronobakteerien osoittaminen EN ISO 22964:2017 standardin mukaan.....	10
4.1.4 Kronobakteerien varmistustestit .....	12
4.2. Kronobakteerien tunnistamisen haasteet .....	13
5. Kronobakteerit elintarvikkeissa ja ympärillämme .....	14
5.1 Äidinmaidonkorvike ja siihen liittyvät mikrobiologiset riskit .....	14
5.1.1 Jauhemainen äidinmaidonkorvike ja taudinpurkaukset .....	15
5.1.2 Äidinmaidonkorvikkeen koostumus ja valmistus .....	18
5.1.3 Suositukset ja ohjeet äidinmaidonkorvikkeen käyttöön kuluttajille .....	19
5.1.4 Jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen riskiominaisuudet .....	21
5.2 Muut elintarvikkeet.....	23
5.3 Kronobakteerit ympäristössä .....	25
6. POHDINTA .....	29
8. Kiitokset .....	31
7. LÄHTEET .....	32

# 1. JOHDANTO

*Cronobacter spp.* eli kronobakteerit ovat harvinaisia, mutta vakaviakin sairauksia aiheuttavia, opportunistisia taudinaiheuttajia (Iversen ym. 2008b). Kronobakteerit voivat aiheuttaa vastasyntyneille muun muassa kuolioista suolistotulehdusta, verenmyrkytystä sekä aivokalvontulehdusta ja kronobakteeri-infektioita on raportoitu myös vanhuksilla ja immuunipuutteisilla aikuisilla (Muytjens ym. 1983, Bowen ja Braden 2006). Maailmalla on raportoitu useita kronobakteerien aiheuttamia taudinpurkauksia, joissa vastasyntyneiden infektiot on yhdistetty jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeen käyttöön (Himelright ym. 2002). WHO onkin luokitellut kronobakteerit luokkaan, jolla on todettu selkeää näyttöä mikro-organismin taudinaiheutuskyvystä jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeiden välityksellä. Kronobakteerien aiheuttamien riskien vuoksi WHO on luonut äidinmaidonkorvikkeen käyttöön tarkat ohjeistukset turvallisesta valmistamisesta, käsittelystä sekä säilytyksestä (WHO ja FAO 2007). Jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeiden turvallisuuteen vaikuttaa niin tehdasolosuhteet ja tehdasympäristö, kotiolosuhteissa tapahtuva äidinmaidonkorvikkeen käsittely sekä sairaaloissa erityisesti riskiryhmiin kuuluvien lasten ruokinnasta huolehtiminen (WHO ja FAO 2007, Pei ym. 2019).

On tärkeää ymmärtää kronobakteerien esiintymisestä ympäristössä, jotta esimerkiksi elintarvikkeiden kontaminoitumista kronobakteerilla voitaisiin ehkäistä ja monitoroida paremmin. Erityisen tärkeää olisi ymmärtää kronobakteerien kulkeutumista ympäristöstä elintarvikkeisiin ja erityisesti jauhemaiseen äidinmaidonkorvikkeeseen. Huoli kronobakteerien vaarallisuudesta ja yhteydestä vastasyntyneiden vakaviin sairastapauksiin on luonut tarpeen kyseisen bakteerin tarkemmalle tutkimiselle. Tämä lissensiaatintutkielma on kirjallisuuskatsaus, jonka tarkoituksena on koota tällä hetkellä saatavilla olevaa tietoa *Cronobacter*-suvun bakteerien ominaisuuksista niin bakteereina, taudinaiheuttajina kuin elintarvikehygieenisinä riskeinä.

## 2. *Cronobacter* spp.

*Enterobacter sakazakii*-laji kuvattiin ensimmäisen kerran vuonna 1980 omana, *Enterobacter*-sukuun kuuluvana lajinaan (Farmer ym. 1980). Aiemmin *E. sakazakii* oli tunnettu ”keltaista pigmenttiä tuottavana *Enterobacter cloacae* -bakteerina”. Tätä keltaista pigmenttiä tuottavaa bakteeria oli eristetty muun muassa elintarvikkeista, ihmisten haavoista ja eritteistä. Se oli myös yhdistetty vastasyntyneiden aivokalvontulehdukseen (Farmer ym. 1980). Farmer ym. (1980) nimesi uuden bakteerilajin kuuluisan japanilaisen mikrobiologin Riichi Sakazakin mukaan *Enterobacter sakazakiiksi*. Myöhemmin Iversen ym. (2007a) tunnistivat taksonomisissa tutkimuksissaan *E. sakazakii* -bakteerin edustavan uutta enterobakteeriheimon sukua, jonka he nimesivät *Cronobacter* -suvuksi (Iversen ym. 2007a). *Cronobacter*-suku sai nimensä kreikkalaisen Kronos-taruhahmon mukaan, joka tarinoiden mukaan nieli vastasyntyneet lapsensa (Graves 1992). Kronobakteerien sukuun kuuluu kirjoittamisen hetkellä (v. 2020) seitsemän lajia: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter universalis*, *Cronobacter dubliensis* sekä *Cronobacter condimenti* (Iversen ym. 2007a, Joseph ym. 2012). Kronobakteerit ovat gramnegatiivisia sauvoja, jotka ovat kooltaan noin  $3 \times 1 \mu\text{m}$ . Kronobakteerit ovat opportunistisia taudinaiheuttajia eli patogeeneja ja fakultatiivisesti anaerobisia, itiöttömiä ja liikkuvia bakteereita, joilla on flagella (Iversen ym. 2008b).

Kronobakteereja on eristetty muun muassa jauhemaisista äidinmaidonkorvikkeista, joiden välityksellä kronobakteerit ovat aiheuttaneet vastasyntyneiden vakavia sairastumisia (Friedemann 2009, Sani ja Odeyemi 2015). Kronobakteerit muodostavat biofilmejä, mikä parantaa bakteerin selviytymistä pinnoilla ja elintarviketehtaissa sekä aiheuttaa riskin bakteerin kontaminaatiolähteen muodostumiselle (Kim ym. 2006). Kronobakteerit pystyvät kiinnittymään ja muodostamaan biofilmiä muun muassa silikoni-, lateksi-, polykarbonaatti-pinnoille ja ruostumattomiin teräspintoihin (Iversen ym. 2004). Näitä materiaaleja käytetään yleisesti esimerkiksi pienten lasten ruoka-astioiden materiaaleina. Osa kronobakteereista pystyy muodostamaan ympärilleen kapselin, mikä on yhteydessä biofilmin muodostukseen (Iversen ym. 2004).

## 2.1 Kasvuolosuhteet ja kasvua rajoittavat tekijät

Iversen ym. (2004) osoittivat tutkimuksissaan, että kronobakteerien optimikasvulämpötila on 37-43 °C, mutta ne pystyvät kasvamaan lämpötilavälillä 6-45 °C, eli myös jääkaappilämpötiloissa. Yleisesti käytössä olevat pastörintikäytännöt (15 sekunnin ajan 72 °C:ssa) tuhoavat tehokkaasti kronobakteerit (Iversen ym. 2008b). Kronobakteerit pystyvät kasvamaan pH:ssa 5-10 (Iversen ym. 2008b). Nämä bakteerit kestävät hyvin korkeita suolapitoisuuksia: vasta yli 10 % natriumkloridipitoisuus ehkäisee kronobakteerien kasvua (Iversen ym. 2008b). Kronobakteerit säilyvät hyvin kuivissa olosuhteissa ja kestävät alhaista vesiaktiivisuutta (Beuchat ym. 2009, Lang ym. 2017). Kronobakteerit pystyvät säilymään jopa kaksi vuotta kuivassa maitojauheessa (Barron ja Forsythe 2007). Bakteerin kasvua hidastaa vasta todella matalat vesipitoisuudet (kuten  $a_w$  0,11-0,58) yhdistettynä elintarvikkeen tehokkaaseen kuivausprosessiin (Lang ym. 2017).

## 2.2 Reservuaarit

Kronobakteerien reservuaareista ei ole tarkkaa tietoa, mutta on todettu, etteivät ne kuulu ihmisten tai eläinten normaaliin suolistomikrobiomiin (Iversen ja Forsythe 2003, Molloy ym. 2009). Kronobakteereita on eristetty useista elintarvikkeista, kuten esimerkiksi kasviksista, vihanneksista, riisistä, viljatuotteista, juustosta, lihavalmisteista, teestä, maitotuotteista sekä äidinmaidonkorvikkeista. Elintarvikkeita kontaminoivina lähteinä on pohdittu niin maaperää, vettä kuin kasvimateriaaliakin (Iversen ja Forsythe 2003). Sani ja Odyemi (2015) tekivät vuosina 2008-2014 tutkituista kronobakteerinäytteistä meta-analyysin perusteella päätelmän, että todennäköisin kronobakteerien reservuaari on kasvimateriaali. Kronobakteereja on eristetty myös laajalti erilaisista ympäristönäytteistä, kuten elintarvikelaitoksista ja kotitalouksista tutkituista näytteistä (Kandhai ym. 2004, Pei ym. 2019). Vaikka reservuaarista ei ole tarkkaa tietoa, voidaan todeta, että *Cronobacter* -suvun bakteereita esiintyy laajasti ympäristössä ja elintarvikeketjun raaka-aineissa (Kandhai ym. 2004).

## 2.3 Patogeenisuus ja virulenssitekijät

Kronobakteerien patogeenisuus- ja virulenssimekanismit eivät ole vielä täysin tunnettuja, ja lisätutkimusta aiheesta tarvitaan (FAO ja WHO 2004). Mahdollisia virulenssitekijöitä kronobakteereilla ovat muun muassa ulkomembraaniproteiinit A (OmpA) ja X (OmpX), jotka osallistuvat bakteerin tunkeutumiseen nisäkässoluihin (Mohan Nair ja Venkitanarayanan 2007, Kim ym. 2010). Kronobakteerin ulkomembraaniproteaasi Cpa, eli *Cronobacter* Plasminogen Activator, on yhdistetty muun muassa bakteerin selviytymiseen seerumissa (Franco ym. 2011). Muita kronobakteerien mahdollisia tutkittuja ja pohdittuja virulenssimekanismeja ovat esimerkiksi bakteerin enterotoksiinin tuotto (Pagotto ym. 2003), tehokas raudanhankintajärjestelmä (Grim ym. 2012), kyky käyttää siaalihappoa (Joseph ym. 2012) ja tuottaa sinkkiä sisältävää metalloproteaasia (*zpx*) (Kothary ym. 2007).

## 3. Kronobakteerien kliininen merkitys

Kronobakteerit, useimmiten raportoituna *Cronobacter sakazakii*, voivat aiheuttaa vakavia tauteja erityisesti vastasyntyneille, pikkulapsille (alle 12 kk), vanhuksille sekä muille immuunipuutoksille (Muytjens ym. 1983, Bowen ja Braden 2006). WHO (2010) listaa riskiryhmään kuuluvaksi lisäksi HIV-positiivisten äitien lapset, jotka joutuvat suurella todennäköisyydellä käyttämään äidinmaidonkorvikkeita. Vastasyntyneiden ja pikkulasten *C. sakazakii* -infektiot ovat harvinaisia, mutta usein vakavia ja henkeä uhkaavia. *C. sakazakii* voi aiheuttaa vastasyntyneille ja pikkulapsille muun muassa verenmyrkytystä ja aivokalvontulehdusta sekä kuolioista suolistotulehdusta (Muytjens ym. 1983, Bowen ja Braden 2006). Kuolleisuutta pikkulasten raportoiduissa *C. sakazakii* -infektioissa on pidetty hyvin korkeana, jopa 40-80 % kuolleisuutta on raportoitu vanhemmissa tutkimuksissa (Bowen ja Braden 2006). Vuosina 2000-2008 tehtyjen tapauselostusten mukaan kuolleisuus on ollut kuitenkin keskimäärin 26,9 % (Friedemann 2009). Vanhuksilla ja immuunipuutoksilla on raportoitu muun muassa bakteremiaa, keuhkokuumetta, luutulehdusta sekä virtsatieinfektioita (Lai 2001, Corti ym. 2007).

Kronobakteerien aiheuttamia infektioita raportoidaan todennäköisesti maailmalla vähemmän, kuin mikä niiden todellinen esiintyvyys on (WHO ja FAO 2007). Alhainen raportoitu esiintyvyys johtuu mm. kronobakteeridiagnostiikan haastavuudesta, kuten havaittiin myös

Lepuschitz ym. (2019) tutkimuksessa Euroopan laboratorioissa. Vuonna 2017 Lepuschitz ym. (2019) tutkivat *C. sakazakiin* aiheuttamien infektioiden esiintymistä Euroopassa ja yhteensä 11 maata lähetti vuoden sisällä 36 kliinistä näytettä tutkittavaksi. Näistä 36 näytteestä 21 kappaletta tunnistettiin *C. sakazakii* -bakteeriksi, yksi näyte *C. dublinensis* -bakteeriksi, kolme näytettä *C. malonaticus* -bakteeriksi, yksi näyte *C. universalis* -bakteeriksi ja loput tunnistettiin kokonaan muiksi bakteerisuvuiksi (Lepuschitz ym. 2019). Toisin kuin aikaisemmissa tutkimuksissa ja oppikirjatiedon mukaan on ajateltu, suurin osa Lepuschitzin ym. (2019) tutkimukseen lähetetyistä näytteistä oli peräisin aikuispotilailta, eikä vastasyntyneiltä, joita on pidetty yleisimpänä kronobakteeri-infektioihin sairastuneena ikäryhmänä.

### **3.1 Kronobakteerien aiheuttamat taudinpurkaukset**

Kronobakteerien aiheuttamia infektoita ja laajempia taudinpurkauksia on raportoitu ympäri maailmaa 1900-luvun puolivälistä aina viimevuosiin asti (Urmenyi ja Franklin 1961, Bowen ym. 2017). Mahdollisesti ensimmäisen kerran kronobakteeri-infektio raportoitiin vuonna 1958, kun kaksi vastasyntynyttä lasta kuoli Englannissa ”epätyypillisen pigmentöityneen koliformin” aiheuttamaan infekioon (Urmenyi ja Franklin 1961). Ensimmäinen varmistettu kronobakteerin aiheuttama infektio raportoitiin vuonna 1979 Georgian osavaltiossa Yhdysvalloissa viikon ikäisellä lapsella (Monroe ja Tift 1979).

Kronobakteerien aiheuttamia tautityyppejä on ollut 1980-luvulla muun muassa Alankomaissa, jossa kuuden vuoden aikana sairastui kahdeksan lasta aivokalvontulehdukseen ja verenmyrkytykseen (Muytjens ym. 1983), sekä vuosina 1986-1987 Islannissa, kun Reykjavikin sairaalassa hoidettiin kolmea aivokalvontulehdukseen ja verenmyrkytykseen sairastunutta vastasyntynyttä (Biering ym. 1989). Tautityyppejä on raportoitu 1990-luvulla muun muassa Israelista, jossa Jerusalemin sairaalassa vuosina 1993-1998 oli viisi kronobakteeri-infektioon sairastunutta vastasyntynyttä ja yksi oireeton lapsi, jolta eristettiin kronobakteeri (Block ym. 2002). Laajin tähän mennessä raportoitu kronobakteerin aiheuttama taudinpurkaus tapahtui vuonna 1998 Belgiassa, missä 12 vastasyntynyttä sairastui kuolioiseen suolistotulehdukseen brysseliläisessä sairaalassa (van Acker ym. 2001). Ranskassa vuonna 2004 havaittiin kronobakteerien aiheuttama taudinpurkaus, jossa neljällä vastasyntyneellä todettiin kronobakteerin aiheuttamana aivokalvontulehdus, silmätulehdus tai suolistotulehdus lyhyen ajan sisällä useassa eri sairaalassa (Coignard ym. 2006). Viime vuosina on raportoitu yksittäisiä tapauselostuksia kronobakteerien aiheuttamista infektoista niin vastasyntyneillä kuin



aikuisilla (Corti ym. 2007, Tamigniau ym. 2015, McMullan ym. 2018). Suurin osa kronobakteerien aiheuttamista taudinpurkauksista vastasyntyneillä on liittynyt jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen käyttöön (van Acker ym. 2001, Himelright ym. 2002). Äidinmaidonkorvikkeen ja kronobakteerien väliseen yhteyteen sekä näiden taudinpurkausten yksityiskohtiin paneudutaan tarkemmin kappaleessa 5.1.

## **3.2 Vastasyntyneet ja pikkulapset**

### **3.2.1 Aivokalvontulehdus ja verenmyrkytys**

Aivokalvontulehdus eli meningiitti on viruksen tai bakteerin aiheuttama tulehdus aivokalvolla. Bakteeriperäinen aivokalvontulehdus on pikkulapsilla usein henkeä uhkaava sairaus. Vastasyntyneiden yleisimpiä bakteeriperäisen aivokalvontulehduksen aiheuttajia on B-ryhmän streptokokkibakteerit sekä *Escherichia coli* (Gaschignard ym. 2011, Okike ym. 2014). Kuolleisuus bakteeriperäiseen aivokalvontulehdukseen vaihteli alle 90 päivän ikäisillä vauvoilla Iso-Britanniassa ja Irlannissa tehdyssä tutkimuksessa 4-19 % välillä, ollen keskiarvoltaan 8 % (Okike ym. 2014). Ranskassa vuosina 2001-2007 tehdyssä tutkimuksessa kuolleisuus bakteeriperäiseen aivokalvontulehdukseen oli keskimäärin 13 %, mutta keskosilla kuolleisuus oli jopa 25 % (Gaschignard ym. 2011). Friedemann (2009) totesi, että vuosien 2000-2008 tapausselostusten perusteella kronobakteereihin liittyvissä aivokalvontulehduksissa kuolleisuus oli jopa 41,9 %. Näin ollen kronobakteerien aiheuttaman aivokalvontulehduksen kuolleisuus vaikuttaa olevan selkeästi korkeampi kuin bakteeriperäisen aivokalvontulehduksen kuolleisuus keskimäärin. Keskimäärin *C. sakazakii* -bakteerin aiheuttamaan aivokalvontulehdukseen sairastuvat ovat melkein täysiaikaisia ja yleensä alle yhden viikon ikäisiä (Bowen ja Braden 2006, Friedemann 2009). Tilastollisesti tarkasteltuna on todettu, että ei-eurooppalaiset vanhemmat vastasyntyneellä on lisännyt lapsen riskiä kronobakteerin aiheuttamalle aivokalvontulehdukselle (Friedemann 2009). Kronobakteerien aiheuttaman aivokalvontulehduksen komplikaatioita voivat pikkulapsilla olla esimerkiksi selkäytimen paiseet, infarktit, vesipää tai neurologiset kehityshäiriöt (Lai 2001).

Verenmyrkytys eli sepsis tarkoittaa tilaa, jossa verenkiertoon päässyt patogeeni on aiheuttanut henkeä uhkaavan tilan. Sepsiksessä voidaan havaita bakteremiaa eli bakteereita verenkierrrossa sekä tilan aiheuttamia vaurioita monissa elimissä. Keskosuuden ja hyvin alhaisen syntymäpainon (< 1000 grammaa) on todettu olevan kronobakteerien aiheuttaman verenmyrkytyksen riskitekijöitä (Bowen ja Braden 2006). Sepsikseen sairastuneet lapset ovat

usein myös hieman vanhempia kuin meningiittiin sairastuneet keskimäärin (Bowen ja Braden 2006).

### **3.2.2 Nekrotisoiva enterokoliitti**

Nekrotisoiva enterokoliitti eli NEC (eng. necrotizing enterocolitis) on yksi vastasyntyneiden yleisimmistä ja vakavimmista infektiivisistä suolistosairauksista (Henry ja Moss 2009). NEC:ssa vastasyntyneen suolistossa on havaittavissa voimakkaita tulehdus- ja kuoliomuutoksia, usein sekä ohut- että paksusuolella. Nekrotisoivaa enterokoliittia tavataan erityisesti keskosilla ja sen riskitekijöitä ovat muun muassa alhainen syntymäpaino sekä äidinmaidonkorvikkeella ruokkiminen (Henry ja Moss 2009). *C. sakazakii* -bakteerin on raportoitu aiheuttaneen useita sporadisia infektioita äidinmaidonkorvikkeiden välityksellä eri puolilla maailmaa (Bowen ja Braden 2006). Taudin patogeneesi on kuitenkin tuntematon ja taudin syntyyn on yhdistetty monia tekijöitä sekä useita eri bakteereja (Henry & Moss 2009). NEC vaatii hoitona tehohoitoa ja noin 20–40 % potilaista tarvitsee kirurgista hoitoa, joka on usein infektoituneen suolenosan poisto (Henry ja Moss 2009). NEC:in jälkitauteina esiintyy muun muassa lyhytsuolisyyttä (eng. short-bowel syndrome) sekä kasvun ja hermoston kehityksen hidastumista. NEC:in kuolleisuus on kohtalaisen korkea, eli arviolta noin 19 % NEC:iin sairastuneista (Friedemann 2009). Lapsilla, jotka joudutaan hoitamaan kirurgisesti, kuolleisuus on kuitenkin selkeästi korkeampi, jopa 20–50 % (Henry ja Moss 2009).

### **3.3 Vanhukset ja muut immuunipuutteiset**

Vanhuksilla ja immuunipuutteisilla aikuisilla kronobakteerien aiheuttamat infektiot ovat harvinaisia, mutta esimerkiksi vuonna 2017 Euroopassa otetuista kliinisistä potilasnäytteistä, joissa todettiin *C. sakazakii*, 94 % oli aikuispotilailta (Lepuschitz ym. 2019). Aikuisilla on raportoitu *C. sakazakii* -bakteerin aiheuttamana muun muassa bakteremiaa, keuhkokuumetta sekä virtsatieinfektioita (Lai 2001, Tamigniau ym. 2015). Useat aikuispotilaista ovat olleet joko iäkkäitä tai he ovat sairastaneet jotain immuunipuolustusta voimakkaasti heikentävää pitkäaikaissairautta, kuten syöpää (Lai 2001). Terveellä nuorella aikuisella on raportoitu *C. sakazakii* -bakteerin aiheuttama luutulehdus eli osteomyeliitti ortopedisen leikkauksen jälkeen (Corti ym. 2007). Aikuisilla suurin osa kronobakteerien aiheuttamista tartunnoista on sairaalainfektioita (Lai 2001).

#### 4. Kronobakteerien osoittaminen elintarvikkeista

Kronobakteerien potentiaalisen taudinaiheutuskyvyn ja vakavien sairastapausten välttämiseksi Euroopan komission asetus (EY) N:o 2073/2005 ja sitä tarkentava asetus (EU) N:o 365/2010 määräävät, että kuivatussa äidinmaidonkorvikkeessa ja kuivatuissa lääkinällisiin tarkoituksiin tarkoitetuissa ruoissa, jotka on suunnattu alle kuuden kuukauden ikäisille lapsille, ei saa esiintyä *Cronobacter spp.* -bakteereita. Kyseisessä asetuksessa ohjeistetaan, että kolmessakymmenessä 10 gramman näytteessä ei saa esiintyä yhtään *Cronobacter spp.* -bakteeria myyntiaikana markkinoille saatetuissa tuotteissa. Eviran (nyk. Ruokavirasto) ohjeen 10501/2 liitteessä 3 on suositeltu, komission asetuksiin (EY) N:o 2073/2005 ja (EU) N:o 365/2010 perustuen, kronobakteerien näytteenottotiheydeksi elintarvikkeista jatkuvatoimista näytteenottoa. Kronobakteereille on laadittu ISO standardi niiden osoittamista varten elintarvikkeista, rehuista ja ympäristönäytteistä (ISO 22964:2017).

*Enterobacteriaceae* -heimoon kuuluvat kronobakteerisuvun bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvoja, joita kasvatetaan laboratoriossa yleensä aerobisesti. Tärkeimpiä kronobakteerien ominaisuuksia, joilla kyseinen bakteerisuku erotetaan muista, on sen kyky fermentoida sakkaroosia ja tuottaa  $\alpha$ -D-glukosidaasia (Iversen ja Druggan 2012). Kronobakteerit ovat oksidaasinegatiivisia ja ne eivät dekarboksyloi L-lysiiniä tai L-ornitiinia (de Benito ym. 2019). Iversen ym. (2007b) toteavat artikkelissaan, että 4-nitrofenyyli- $\alpha$ -D-glukopyranosidisubstraatin hydrolyysitestillä ja hapon muodostus arabitolista ovat erityisen hyödyllisiä testejä, kun kronobakteereita pyritään erottamaan muista enterobakteereista. Kronobakteerien erottaminen muista enterobakteereista on mahdollista myös esimerkiksi tutkimalla DNA-primaasia koodaavaa *dnaG*-geeniä tai  $\alpha$ -glukosidaasia koodaavaa *gluA*-geeniä, joiden sensitiivisyys ja spesifisyys kronobakteereille on 100 % (Iversen ym. 2007b). Keltaisten pesäkkeiden muodostumista -ravintoagarilla ei pidetä enää luotettavana kronobakteerien tunnistuskeinona, sillä kaikki kannat eivät tuota tätä ominaisväriä (Iversen ja Druggan 2012).

Iversen ym. (2007a) vertailivat tutkimuksissaan kronobakteerilajeja ja määrittivät tärkeimmät biokemialliset testit lajien erotusta varten. Eroja lajien välillä on muun muassa indolin tuotossa, malonaatin käytössä, dulcitolin fermentaatiossa ja hapon muodostumisessa metyyli- $\alpha$ -D-glukosidista. Käytännössä elintarviketeollisuudessa kronobakteerilajien erotus toisistaan ei ole ensisijaisen tärkeää, sillä kaikkia lajeja pidetään tällä hetkellä opportunistisina patogeeneinä (Iversen ym. 2007a). Myyntiaikana markkinoille saatetut jauhemaiset äidinmaidonkorvikkeet

sekä lääkinnällisiin tarkoituksiin käytettävät jauhemaiset ruokavaliovalmisteet, jotka ovat tarkoitettu alle 6 kuukauden ikäisille, täytyy tutkia ja todeta, ettei niissä esiinny kronobakteereita (EKa 2073/2005, EKa 365/2010).

## **4.1 ISO 22964:2017 –standardi**

ISO eli International Organization for Standardization julkaisi vuonna 2017 EN ISO 22964:2017 -standardin kronobakteerien osoittamiseksi elintarvikkeista, rehuista ja ympäristönäytteistä. Kyseessä on horisontaalinen menetelmä, joka korvasi aiemman ISO-standardin ISO/TS 22964:2006. Vanhan ISO/TS 22964:2006 -standardin kohdalla oli todettu, että tietyt kasvatusalustat, kuten modifioitu LST-liemi ja *Enterobacteriaceae*-rikastusliemi, sekä käytetyt kasvatusolosuhteet eivät olleet optimaalisia kronobakteerien osoittamiseen, ja tilalle tarvittiin uusi standardi (Iversen ym. 2008a). Uudessa ISO 22964:2017 -standardissa on siirrytty käyttämään kronobakteereille valikoivaa CS-rikastuslientä (Cronobacter Selective Broth) ja CCI-agaria (Chromogenic Cronobacter Isolation agar), sekä täsmennetty kronobakteerien varmistustestejä. De Benito ym. (2019) validoivat ISO 22964:2017 -standardin ja totesivat sen olevan sopiva sekä elintarvikenäytteille, rehunäytteille että tuotantoympäristöstä otetuille näytteille. De Benito ym. (2019) totesivat myös, että menetelmällä oli pääosin korkea spesifisyys ja sensitiivisyys. Spesifisyydellä ja sensitiivisyydellä tarkoitetaan diagnostisen testin tarkkuutta ja herkkyyttä. Spesifisyys tarkoittaa saatujen negatiivisten tulosten osuutta todellisista testin negatiivisista. Sensitiivisyys tarkoittaa saatujen positiivisten tulosten osuutta testin todellisista positiivisista.

### **4.1.1 CS-rikastusliemi**

CS-liemi (Cronobacter Selective Broth, CSB) on kronobakteereille kehitetty rikastusliemi, jolla voidaan testata sekä elintarvikenäytteitä että ympäristönäytteitä. CS-liemi sisältää peptonivettä, lihauutetta, natriumkloridia, bromikresolipunaista, sakkaroosia ja antibioottia (Iversen ym. 2008a). Antibioottina käytetään vankomysiiniä, sillä se estää useiden grampositiivisten bakteerien kasvua rikasteliemessä (Iversen ja Druggan 2012). CS-liemen sensitiivisyys on 100 % kronobakteerien suhteen (Iversen ja Druggan 2012). CS-liemen pH on 7,4 ja kronobakteerit laskevat liemen pH:ta fermentoimalla sakkaroosia (Iversen ym. 2008a). Kun kronobakteereita inkuboidaan CS-liemessä 42 °C:ssa vuorokauden ajan, liemen väri muuttuu violetista

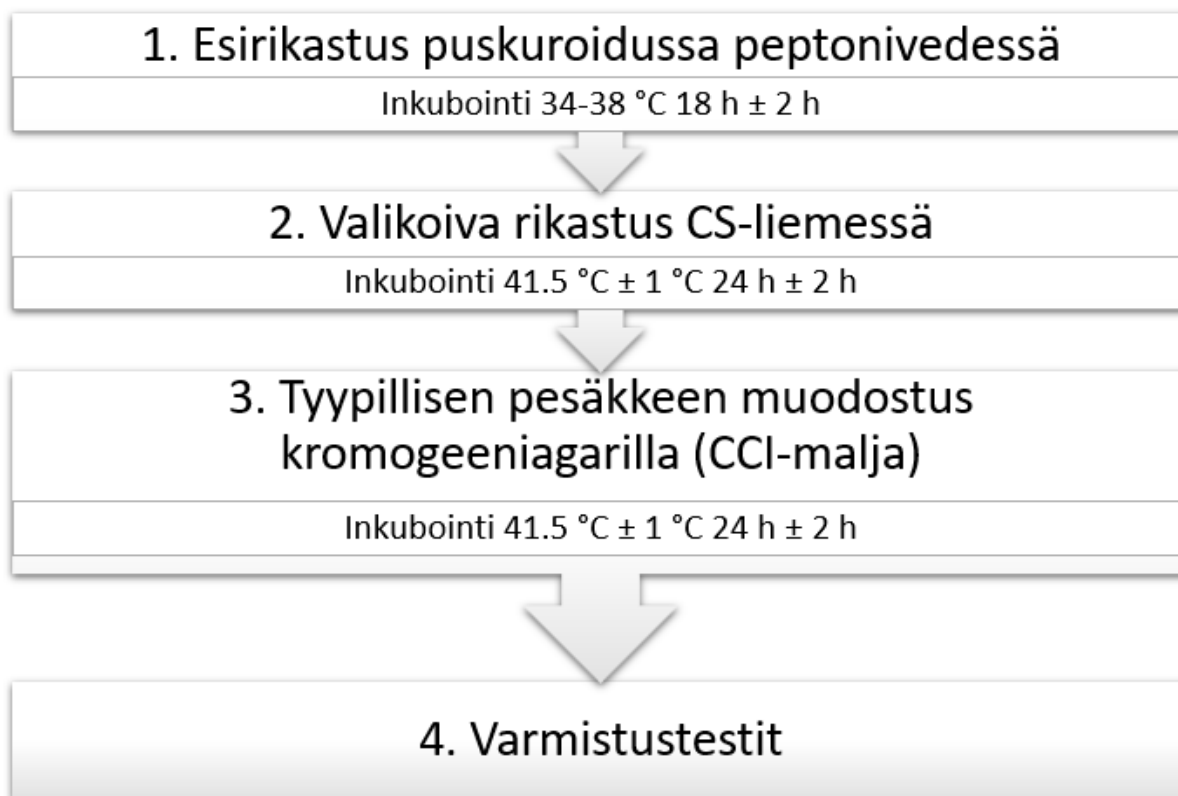
keltaiseksi. Ne CS-liemet, jotka eivät vaihda väriä keltaiseksi 48 tunnissa, tulkitaan negatiivisiksi kronobakteerien suhteen (Iversen ja Druggan 2012). Kronobakteerien osoittamisen lopullinen tarkkuus CSB-testillä riippuu kuitenkin käytetyn kromogeenisen agarin spesifisyydestä ja sensitiivisyydestä (Iversen ja Druggan 2012).

#### **4.1.2 CCI-malja**

CCI-malja eli Chromogenic Cronobacter Isolation -agarmalja on kronobakteereille kehitetty kromogeeninen kasvatusalusta (Iversen ja Druggan 2012). CCI-malja sisältää agaria, tryptonia, hiivauutetta, natriumkloridia, 5-bromi-4-kloro-3-indolyyli-D-glukopyranosidia, tiosulfaattia, natriumdesoksikolaattia sekä ammoniumrautasitraattia (Iversen ym. 2008a). CCI-maljan toiminta perustuu kronobakteerien glukosidaasientsyymien aktiivisuuteen ja kromogeeninä käytetään 5-bromo-4-kloro-3-indolyyli- $\alpha$ -D-glukopyranosidia (Iversen ym. 2008a). Tyypilliset kronobakteeripesäkkeet värjäytyvät CCI-agarilla sinivihreiksi inkuboituna 42 °C 24 tuntia (Iversen ym. 2008a, de Benito ym. 2019). Muut bakteerit, jotka kykenevät hydrolysoimaan 5-bromo-4-kloro-3-indolyyli- $\alpha$ -D-glukopyranosidia voidaan erottaa kronobakteerisuvun bakteereista testaamalla niiden kyky fermentoida sakkaroosia CS-liemessä. Näiden testien tekemistä rinnakkain suositellaan, sillä se nostaa testien sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä (Iversen ja Druggan 2012).

#### **4.1.3 Kronobakteerien osoittaminen EN ISO 22964:2017 standardin mukaan**

Kronobakteerin horisontaalinen osoittaminen EN ISO 22964:2017 standardin mukaan tapahtuu karkeasti esirikastuksen, selektiivisen rikastuksen, tunnistamisen, puhdasviljelyn ja varmennustestien avulla (kuva 1).



**Kuva 1.** Kronobakteerien osoitus elintarvike-, rehu- ja ympäristönäytteissä sisältää esirikastuksen, valikoivan rikastuksen, viljelyn kromogeenisellä maljalla sekä varmistustestit (ISO 22964:2017).

Esirikastus tapahtuu puskuroidussa peptonivedessä, jota inkuboidaan 34-38 °C lämpötilassa 18 ± 2 tuntia. Esirikastuksen tarkoituksena on elvyttää vaurioituneita bakteerisoluja, mutta ei vielä valikoida näytteen bakteereita (Iversen ja Druggan 2012). Maitojauheen kuivauksen aiheuttaman stressin vuoksi kronobakteerit kaipaavat nestettä ja solujen toipuminen edellyttää hellävaraista käsittelyä esirikastusvaiheessa (Iversen ja Druggan 2012). Esirikastuksen jälkeen seuraa valikoiva rikastus CS-liemessä. CS-lientä inkuboidaan 41.5 °C ± 1 °C lämpötilassa 24 ± 2 tunnin ajan. Valikoivan rikastuksen jälkeen näyte viljellään kromogeeniselle CCI-maljalle ja maljoja inkuboidaan 41.5 °C ± 1 °C lämpötilassa 24 ± 2 tunnin ajan. CCI- maljalla kasvavat tyypilliset kronobakteeripesäkkeet puhdasviljellään ravintoagarille (esimerkiksi tryptoni-soija-agarille). Viidestä puhdasviljellystä tyypillisestä kronobakteeripesäkkeestä tehdään tarvittavat varmistustestit (ISO 22964:2017).

#### 4.1.4 Kronobakteerien varmistustestit

EN ISO 22964:2017 standardissa määritettyjä kronobakteerien varmistustestejä (taulukko 1) on oksidaasitesti, 4-nitrofenyyli- $\alpha$ -D-glukopyranosidisubstraatin hydrolyysitesti sekä L-lysiinin ja L-ornitiinin dekarboksylaasitesti. Kronobakteerit muodostavat happoa muun muassa D-arabitolista, D-sorbitolista ja D-sakkaroosista. Valinnaisina testeinä standardissa luetellaan metyyliipuna- ja Voges-Proskauer -testi sekä hapon muodostus  $\alpha$ -metyyli-D-glukosidista. De Benito ym. (2019) esittävät artikkelissaan, että osassa varmistustesteistä testitulos edustaa suurinta osaa kronobakteerilajeista, mutta joidenkin kronobakteerilajien tulos voi tästä erota. Tällaisia ovat L-ornitiinin dekarboksylaasi-, metyyliipuna- ja Voges-Proskauer -testi sekä hapon muodostus D-arabitolista ja  $\alpha$ -metyyli-D-glukosidista (de Benito ym. 2019).

**Taulukko 1.** ISO 22964:2017 standardissa määritelty varmistustestit kronobakteerien määrittämiseksi (ISO 22964:2017, de Benito ym. 2019)

Varmistustestit	Tulos positiivinen	Tulos negatiivinen
4-nitrofenyyli $\alpha$ -D-glukopyranosidin hydrolyysi	X	
Oksidaasitesti		X
L-Lysiinin dekarboksylaasitesti		X
L-Ornitiinin dekarboksylaasitesti		X <sup>b</sup>
Hapon muodostus D-sakkaroosista	X	
Hapon muodostus D-sorbitolista		X
Hapon muodostus D-arabitolista		X <sup>b</sup>
Metyyliipunatesti <sup>a</sup>		X <sup>b</sup>
Voges-Proskauer <sup>a</sup>	X <sup>b</sup>	
Hapon muodostus $\alpha$ -metyyli-D-glukosidista <sup>a</sup>	X <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Valinnainen varmistustesti

<sup>b</sup> Suurin osa kronobakteereista edustaa tätä tulosta (De Benito ym. 2019)

## 4.2. Kronobakteerien tunnistamisen haasteet

Haasteita kronobakteerien tutkimisessa aiheuttavat muun muassa samankaltaisia ominaisuuksia omaavat muut bakteerilajit, elatusaineiden antibioottivalinnat sekä tutkittavan näytteen sisältämät inhiboivat ainesosat (Iversen ym. 2008a, de Benito ym. 2019). Kronobakteerien määrittämiselle haasteita aiheuttavat useat muut enterobakteeriheimon lajit, joilla on samankaltaisia ominaisuuksia kuin kronobakteereilla. Tällaisia lajeja on muun muassa *Franconibacter pulveris* (ent. *Enterobacter pulveris*), *Franconibacter helveticus* (ent. *Enterobacter helveticus*), *Siccibacter turicensis* (ent. *Enterobacter turicensis*) sekä *Enterobacter cloacae* (Druggan ja Iversen 2009, de Benito ym. 2019). *E. pulveris*, *E. helveticus* ja *E. turicensis* -bakteerien taksonomiaa täsmennettäessä, niiden kuulumista *Cronobacter* -sukuun pohdittiin, kunnes Stephanin ym. (2014) tarkemmissa tutkimuksissa nämä bakteerit luokiteltiin kuuluvaksi *Franconibacter spp.* ja *Siccibacter spp.* -sukuihin. Nämä bakteerit esiintyvät luonnossa samoissa ympäristöissä kuin kronobakteerit ja niitä on löytynyt esimerkiksi vastasyntyneiden jauhemaisista äidinmaidonkorvikkeista sekä niiden tuotantoympäristöissä (Iversen ym. 2008a). Haasteita nämä bakteerit aiheuttavat siksi, että ne ovat ominaisuuksiltaan lähellä kronobakteereita ja pystyvät esimerkiksi muodostamaan tyypillisen näköisiä pesäkkeitä kronobakteereille kehitetyillä kromogeenisillä agareilla (Iversen ym. 2008a). Muun muassa *F. pulveris* pystyy kronobakteerien tavoin fermentoimaan sakkaroosia ja metaboloimaan 5-bromo-4-kloori-3-indolyyli-D-glukopyranosidia, joten bakteerit tulee erottaa toisistaan muilla varmennustesteillä, kuten Voges-Proskauer, D-arabitolin fermentaatio- tai metyyliipunatestillä (Iversen ym. 2008a). *F. pulveris*, *F. helveticus* ja *S. turicensis* bakteereita ei pidetä ihmisille vaarallisina patogeeneina (Stephan ym. 2014), kun taas *E. cloacae* on merkittävä opportunistinen patogeeni erityisesti sairaalapotilaille (Fernandez-Baca ym. 2001). De Benito ym. (2019) tutkimuksissa todettiin, että ISO 22964:2017 standardin sensitiivisyyteen voi vaikuttaa muun muassa *Enterobacter cloacae* -bakteeri. Kyseisen tutkimuksen näytteissä, jotka sisälsivät sekä *Cronobacter spp.* että *Enterobacter cloacae* -bakteereita todettiin, että *E. cloacae* pystyi kasvamaan vankomysiiniä sisältävässä CS-kasvatusliemessä. CCI-maljalla *E. cloacae* voi peittää kronobakteerien kasvuston alleen, mutta *E. cloacae* muodostamat pesäkkeet ovat epätyypillisiä (de Benito ym. 2019). *E. cloacae* pystyy kasvamaan samoissa lämpötiloissa kuin kronobakteerit, eli jopa 41,5 °C asteessa (de Benito ym. 2019).



Kronobakteerien osoittamistutkimuksissa ongelmia aiheuttaa myös se, että suurin osa kronobakteereista on huomattavasti herkempiä antibiooteille kuin monet muut *Enterobacteriaceae* heimoon kuuluvat bakteerilajit (Druggan ja Iversen 2009). Tämä aiheuttaa sen, että kronobakteerien elatusaineisiin ei ole saatavilla sellaista antibioottia, joka olisi näiden bakteerien suhteen selektiivinen. Kronobakteerit ovat resistenttejä vankomysiinille, joten sitä käytetään elatusaineissa grampositiivisten bakteerien kasvun estämiseen (Druggan ja Iversen 2009). De Benito ym. (2019) totesivat, että näytteen ainesosista laktoosilla oli kronobakteerien kasvua inhiboiva vaikutus, mikä voi vaikuttaa EN ISO 22964:2017 standardin sensitiivisyyteen.

## **5. Kronobakteerit elintarvikkeissa ja ympärillämme**

Kronobakteereita on eristetty useista elintarvikkeista, kuten äidinmaidonkorvikkeesta ja kasvipohjaisista tuotteista, sekä niiden tuotantoympäristöistä (Molloy ym. 2009, Sani ja Odeyemi 2015, Pei ym. 2019). Vaikka kronobakteerien reservuaari ja kontaminaatioreitit elintarvikkeisiin ovat vielä tuntemattomia, on reservuaariksi ehdotettu kasviperäistä materiaalia (Sani ja Odeyemi 2015). Kronobakteerien osalta riskielintarvikkeiksi luokitellaan komissionasetuksissa (EY) N:o 2073/2005 ja (EU) 365/2010 kuivattu äidinmaidonkorvike ja kuivatut lääkinällisiin tarkoituksiin tarkoitettut ruuat, jotka on suunnattu alle 6 kuukauden ikäisille lapsille. Kronobakteerien esiintyminen laajalti ympäristössä ja niiden päätyminen riskielintarvikkeisiin vaatii huomiointia sekä elintarviketuotannon toimijoilta, että riskielintarvikkeita käyttäviltä kuluttajilta. Seuraavissa kappaleissa käsitellään kronobakteerien esiintymistä elintarvikkeissa ja niiden tuotantolaitoksissa sekä kronobakteerien aiheuttamia mikrobiologisia riskejä erityisesti äidinmaidonkorvikkeessa ja sen käsittelyssä.

### **5.1 Äidinmaidonkorvike ja siihen liittyvät mikrobiologiset riskit**

Äidinmaidonkorvike on teollisesti valmistettu ihmismaitoa korvaava valmiste, joka on suunniteltu vauvoille ja alle yksivuotiaille lapsille. Äidinmaidonkorvikkeita on markkinoilla monia erilaisia valmisteita, esimerkiksi eri-ikäisille vauvoille (mm. keskosina syntyneille) ja allergisille lapsille on omat valmisteensa. WHO korostaa, että äidinmaidon tulisi olla vauvojen ensisijainen ravinnonlähde, mutta tilanteissa, joissa äidinmaitoa ei ole saatavilla voidaan käyttää teollisia korvikkeita (WHO ja FAO 2007). Tällaisia tilanteita ovat esimerkiksi ne, joissa

äidinmaitoa ei ole saatavilla, äidin maidontuotanto on riittämätöntä tai jokin muu tekijä estää maidon käytön, kuten äidin maitorauhastulehdus tai lääkitys.

Äidinmaidonkorvikkeen käyttöön liittyy voimakkaasti kulttuurilliset sekä taloudelliset tekijät, ja äidinmaidonkorviketta käytetään ympäri maailmaa paljon myös vauvoilla, joilla ei ole erityistä estettä äidinmaidon käytölle. Sairaalasynnytysten yleistyessä 1900-luvun aikana alkoi kulttuurimuutos imetyksessä ja markkinat avautuivat teollisille äidinmaitovalmisteille. Ensimmäisiä äidinmaidonkorvikkeita oli vuonna 1865 markkinoille tullut Liebigin lehmänmaitopohjainen äidinmaidonkorvike. Markkinoille ilmestyi 1900-luvulla myös useita korvikekilpailijoita. Sekä soija- että maitopohjaisissa korvikkeissa havaittiin kuitenkin merkittäviä ravitsemuksellisia puutteita ja tästä syystä luotiin asetuksia ja vaatimuksia äidinmaidonkorvikkeiden ravintosisällöstä. Kulttuuritekijöiden muutosten ja äidinmaidonkorvikkeiden markkinoinnin takia vauvojen pulloruokinta korvikkeilla yleistyi ja imetys lähti laskuun. Äidinmaidonkorvikkeiden aggressiiviseen markkinointiin sairaaloissa, esimerkiksi ilmaisnäytteiden jakamiseen, on puututtu ja tietoa äidinmaidon merkityksestä sekä ensisijaisuudesta ravintona vauvoille on kampanjoitu ympäri maailmaa, ja suhtautuminen imetykseen on muuttunut positiivisempaan suuntaan (Guo 2014). Suomessa äidinmaidonkorvikkeiden mainonnasta ja myynnistä on säädetty esimerkiksi kauppa- ja teollisuusministeriön asetuksessa äidinmaidonkorvikkeesta ja vierotusvalmisteesta 1216/2007 16 §:ssä, jossa kerrotaan, että tieteelliseen tietoon perustuvaa mainontaa saa äidinmaidonkorvikkeista kohdistaa vain ammattihenkilökunnalle, sekä 17 §:ssä, jossa kerrotaan, että vähittäismyymälöissä ei saa esimerkiksi jakaa äidinmaidonkorvikenäytteitä tai markkinoida äidinmaidonkorviketta erikoistarjouksella.

### **5.1.1 Jauhemainen äidinmaidonkorvike ja taudinpurkaukset**

Jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen käyttö vastasyntyneillä ja kronobakteeri-infektioiden yhteys varmistui 2000-luvun alussa (Himelright ym. 2002), mutta jo monia vuosikymmeniä aikaisemmin oli raportoitu useista kronobakteerin aiheuttamista taudinpurkauksista tai tautirypäistä sairaaloissa eripuolilla maailmaa (Muytjens ym. 1983, Biering ym. 1989, van Acker ym. 2001, Coignard ym. 2006). Monissa näistä tapauksissa oli löydetty kronobakteerilla kontaminoituneita maitojauhe-eriä tai äidinmaidonkorvikkeen tekoon käytettyjen välineiden todettiin olleen kontaminoituneita kronobakteereilla (Biering ym. 1989, van Acker ym. 2001, Block ym. 2002, Coignard ym. 2006).

Jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen ja kronobakteerien aiheuttamien infektioiden mahdollisesta yhteydestä raportoitiin ensimmäisen kerran vuonna 1983, kun kuuden vuoden aikana kahdeksan vastasyntyntä oli sairastunut aivokalvontulehdukseen ja verenmyrkytykseen Alankomaissa (Muytjens ym. 1983). Kahdeksasta sairastuneesta vain kaksi selvisi hengissä akuutista infektiosta, mutta hekin kuolivat myöhemmin infektioiden aiheuttamiin komplikaatioihin 16 kuukauden ja 2,5 vuoden ikäisinä. Muytjens ym. (1983) raportoivat, että sairaalasta otetuista näytteistä eristettiin kronobakteereita käyttövalmiista äidinmaidonkorvikkeesta, tiskiharjoista ja sekoituslusikoista, mutta ei äidinmaitojauheesta tai vedestä otetuista näytteistä. Välineistä ja äidinmaidonkorvikkeesta eristetyt kronobakteerikannat erosivat kuitenkin toisistaan plasmidien koon perusteella, joten kronobakteerien tartuntareitti jäi epäselväksi (Muytjens ym. 1983).

Vuosina 1986-1987 Islannissa kolme vastasyntyntä sairastui kronobakteerin aiheuttamaan infektiin Reykjavikin sairaalassa (Biering ym. 1989). Reykjavikin sairaalassa tutkittiin ympäristönäytteitä infektioiden lähteen selvittämiseksi, ja kronobakteereita löydettiin sairaalan käyttämistä jauhemaisista äidinmaidonkorvike-eristä (Biering ym. 1989). Jerusalemissa raportoitiin sairaalassa vuosina 1993-1998 tapahtuneesta tautiryppästä, jossa sairastui kaksi keskosta, kaksi täysiaikaista vauvaa ja yksi keisarileikkauksella syntynyt vauva kronobakteeri-infektioihin (Block ym. 2002). Lisäksi kronobakteeri eristettiin oireettoman 6-vuotiaan pojan keskuslaskimokatetrasta. Kronobakteereja eristettiin sairaalassa valmiista äidinmaidonkorvikkeesta, sekä äidinmaidonkorvikkeen tekoon käytetystä tehosekoittimesta (Block ym. 2002). Kronobakteeria ei löydetty äidinmaidonkorvikkeen valmistukseen käytetystä maitojauheesta, jolloin kontaminaatio äidinmaidonkorvikkeen teon yhteydessä keittiövälineistä oli todennäköinen persistoivan kontaminaation lähde (Block ym. 2002).

Jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen ja kronobakteerien aiheuttamien infektioiden välinen epidemiologinen yhteys varmistui vuonna 2001, kun keisarileikkauksella syntyneen pojan kuolema kronobakteeri-infektioon käynnisti vastasyntyneiden teho-osastolla kohorttitutkimuksen, johon osallistui yhteensä 49 vastasyntyntä kyseisellä osastolla (Himmelright ym. 2002). Tutkimuksessa todettiin, että riskianalyysissä vain tietyn jauhemaisen äidinmaidonkorvikemerkin käytöllä oli merkittävä yhteys kronobakteeri-infektioon tai -kolonisaatioon (Himmelright ym. 2002). Kronobakteereita eristettiin sekä avatuista että avaamattomista kyseisen valmistajan maitojauhepurkeista ja maitojauheesta löytyneiden

kronobakteerien sekä potilaista eristettyjen bakteerien yhteys varmistettiin PCR-menetelmällä (Himelright ym. 2002).

Van Acker ym. (2001) raportoi tähän mennessä laajimmasta kronobakteerien aiheuttamasta taudinpurkauksesta, joka tapahtui kesällä 1998 Brysselissä vastasyntyneiden teho-osastolla. Yhteensä 12 vastasyntynyttä sairastui kahden kuukauden aikana kuolioiseen suolistotulehdukseen (NEC) ja kaksi sairastuneista kuoli (van Acker ym. 2001). Puolella sairastuneista eristettiin kronobakteereita potilasnäytteistä, ja kymmenen kahdestatoista sairastuneesta lapsesta oli saanut suun kautta saman valmistajan jauhemaista äidinmaidonkorviketta sairaalassa ollessaan. Kronobakteereita eristettiin sairaalassa sekä valmiista äidinmaidonkorvikkeesta että avaamattomista äidinmaidonkorvikejauhepakkauksista. Tapausten ilmaantuminen loppui kyseisellä vastasyntyneiden teho-osastolla, kun kontaminoituneiden äidinmaidonkorvike-erien käyttö lopetettiin (van Acker ym. 2001).

Ranskassa raportoitiin syksyllä 2004 kronobakteerien aiheuttamia infektioita neljällä vastasyntyneellä eri sairaaloissa, sairastuneista kaksi kuoli (Coignard ym. 2006). Kaikki neljä saivat joko tuttipullosta tai ruokintaletkun kautta saman valmistajan jauheesta tehtyä äidinmaidonkorviketta. Lyhyen aikaikkunan sisällä tulleet ilmoitukset vakavista kronobakteeri-infektioista käynnistivät kansallisen hälytyksen Ranskassa, infektioiden alkuperää ruvettiin selvittämään ja sairaaloissa käytetyt äidinmaitokorvikejauheet vedettiin pian markkinoilta (Coignard ym. 2006). Sairaaloissa käytetyistä jauhemaisista äidinmaidonkorvikkeista eristettiin kronobakteereita saman valmistajan neljästä eri erästä, jotka oli valmistettu saman vuoden huhti-syyskuussa. Sairaaloissa havaittiin tutkimuksen myötä puutteita myös muun muassa äidinmaidonkorvikkeiden valmistelussa, valmistustavan hygieniassa, jääkaappisäilytyslämpötiloissa sekä siinä, että useassa sairaalassa valmista äidinmaidonkorviketta säilytettiin liian pitkiä aikoja, jopa 24 tuntia (Coignard ym. 2006).

### 5.1.2 Äidinmaidonkorvikkeen koostumus ja valmistus

Äidinmaidonkorvikkeiden tarkoituksena on matkia äidinmaidon luontaista koostumusta ja ravintosisältöä mahdollisimman tarkasti (Guo 2014). Äidinmaidonkorvikkeen pohjana käytetään yleisimmin lehmänmaitoa, mutta myös soijamaidosta valmistettuja korvikkeita on markkinoilla. Äidinmaidonkorvikkeet ovat joko sellaisenaan nautittavaksi tarkoitettuja tai sellaisia jauhemaisia valmisteita, joihin lisätään ainoastaan vesi. Kauppa- ja teollisuusministeriön asetuksen 1216/2007 liitteellä 1 säädellään äidinmaidonkorvikkeiden ainesosia, joita on muun muassa proteiinit, koliini, rasvat, inositol, kivennäisaineet, vitamiinit ja hiilihydraatit.

Äidinmaidonkorvikkeet valmistetaan yleisimmin joko märkäsekoitus- tai kuivasekoitusmenetelmällä tai näiden yhdistelmällä. Märkäsekoitusmenetelmässä kaikki äidinmaidonkorvikkeen raaka-aineet käsitellään nestemäisinä ja prosessivaiheita ovat muun muassa nesteiden homogenisointi, tuotteen lämpökäsittely, konsentroiminen haihuttamalla ja kuivaus. Kuivasekoitusprosessissa kaikki korvikkeen aineosat käsitellään ja sekoitetaan keskenään kuivina jauheina. Yhdistelmämenetelmässä osa korvikkeen raaka-aineista käsitellään nestemäisinä ja kuivataan, jonka jälkeen tuotteeseen lisätään vielä lämpökäsittelyjen jälkeen kuivia jauhemaisia ainesosia. Yhdistelmämenetelmän kriittisinä kontrollipisteinä (CCP) käytetään raakamaidon pastörintia ja konsentroidun maidon sterilointia tyhjiösekoitusvaiheessa (Codex Alimentarius 2008).

Pei ym. (2019) totesi tutkimuksessaan, että kuivasekoitusmenetelmä on valmistustavoista riskialttein kronobakteerikontaminaatiolle. Tutkijat esittivät tämän syyksi mahdollisesti kontaminoituneita raaka-aineita ja steriloivien prosessien puuttumista kuivasekoitusmenetelmissä tutkituissa tehtaissa. Pei ym. (2019) tutkimuksessa todettiin äidinmaidonkorvikkeen raaka-aineista otetuissa näytteissä *Cronobacter*-suvun bakteereita muun muassa proteiini- ja hiilihydraattinäytteissä sekä raakamaidossa.

### 5.1.3 Suositukset ja ohjeet äidinmaidonkorvikkeen käyttöön kuluttajille

Maailman terveysjärjestö eli WHO on luonut äidinmaidonkorvikkeen käyttöön tarkat ohjeet valmisteen turvallisesta valmistamisesta, käsittelystä sekä säilytyksestä. Ohjeiden tarkoituksena on vähentää *Cronobacter spp.* ja *Salmonella enterica* -bakteerien riskiä äidinmaidonkorvikkeissa (WHO ja FAO 2007). Tärkeimmät keinot riskien minimointiin on äidinmaidonkorvikkeen valmistukseen käytetyn veden kuumentaminen ja sekoittaminen jauheeseen vähintään 70 °C lämpöisenä ja valmisteen käyttäminen mahdollisimman nopeasti sen valmistamisen jälkeen (FAO ja WHO 2006). WHO korostaa, että äidinmaidonkorvikkeen turvallisen valmistuksen edellytyksiä on se, että valmistuksessa on saatavilla niin puhdasta vettä kuin saippuaa sekä puhdas tila, jossa on veden keittämismahdollisuus sekä jääkaappi.

WHO ohjeistaa, että kaikki pulloruokintaan käytetyt välineet tulee pestä kuumalla saippuavedellä, jonka jälkeen ne on steriloitava esimerkiksi keittämällä. Äidinmaidonkorvikkeen valmistamisesta jauheesta ohjeistetaan, että tulee valmistaa vain tarvittava määrä korviketta, se tulee tarjoilla mahdollisimman nopeasti valmistuksen jälkeen ja ylijäänyt korvike tulee heittää pois. Valmistuslämpötiloista ohjeistetaan kiehattamaan vesi, jähdyttämään sitä hetki, mutta ei alle 70 °C lämpötilaan, jonka jälkeen kuuma vesi sekoitetaan maitojauheeseen ja jähdytetään tarjoilulämpötilaan esimerkiksi kylmässä vesihauteessa. Äidinmaidonkorvike, joka valmistetaan ja jähdytetään välittömästi, voidaan ohjeistuksen mukaan säilyttää jääkaapissa alle 5 °C lämpötilassa maksimissaan 24 tuntia (WHO ja FAO 2007).

WHO:n asiantuntijoiden kokouksessa todettiin, että yli 70 °C veden lisääminen maitojauheeseen tappaa tehokkaasti siinä esiintyviä bakteereita ja pienentää voimakkaasti tuotteen potentiaalista mikrobiologista riskiä (FAO ja WHO 2006). Samalla havaittiin, että alhaisemmat lämpötilat (40–50 °C), jotka olivat yleisesti käytössä joissakin äidinmaidonkorvikkeiden valmistusohjeissa, jopa lisäsivät tuotteen suhteellista riskiä, mikäli tuotetta ei nautittu välittömästi. Kuuman veden käyttämisen mahdollisia haittapuolia on esimerkiksi lämpöherkkien ainesosien vaurioituminen, jauheen mahdollinen paakkuuntuminen sekä tiettyjen bakteeri-itiöiden aktivoituminen (FAO ja WHO 2006). WHO:n asiantuntijoiden kokouksessa todettiin, että mikään äidinmaidonkorvikkeen ainesosista ei kärsinyt merkittävästi yli 70 °C veden käytöstä, ja jopa lämpöherkimmän C-vitamiinin tasot pysyivät hyväksyttävänä. Bakteeri-itiöiden mahdollisen aktivoitumisen (FAO ja WHO 2006). WHO huomioi

ohjeistamalla valmistetun korvikkeen nautittavaksi välittömästi, mikä pienentää syntyvää riskiä merkittävästi.

Chap ym. (2009) tutkimuksessa todettiin, että maailmalla myytävissä äidinmaidonkorvikepaketeissa vaadittavat merkinnät, esimerkiksi veden lämpötiloista, olivat epäselviä. Tutkimuksessa käytiin läpi markkinoilla olevia tuotteita Iso-Britanniasta, Portugalista, Brasiliasta, Indonesiasta, Malesiasta, Koreasta ja Jordaniasta. Tutkimuksessa havaittiin, että ainoa maa, jossa pakkausmerkinnöissä veden lämpötilaksi ohjeistettiin WHO:n suosittelema yli 70 °C oli Korea. Muissa maissa ohjeistettiin vedenlämpötilaksi esimerkiksi 40 °C tai suurpiirteisesti haaleaa veden lämpötilaa (Chap ym. 2009).

Jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen käytöstä kotitalouksissa tehdyssä italialaisessa tutkimuksessa havaittiin, että vain 11 % tutkimukseen osallistuneista 131 vanhemmasta valmisti äidinmaidonkorvikkeen WHO:n ohjeiden mukaan (Carletti ja Cattaneo 2008). Vanhemmista 62 % oli saanut opastuksen jauhemaisen äidinmaidon käyttöön terveydenhuollon ammattilaisilta, mutta loput valmistivat äidinmaidonkorvikkeen jauhepakkausten kyljessä olevien ohjeiden perusteella (Carletti ja Cattaneo 2008). Käsienpesun ennen äidinmaidonkorvikkeen valmistusta suoritti aina 82 % vanhemmista ja harvoin tai ei koskaan käsiään pesi 13 % vanhemmista. Tuttipullon pesi ennen käyttöä 48 % vanhemmista, kun taas harvoin tai ei koskaan tuttipulloa pesi 43 % vanhemmista. Jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen tekoon käytetty vesi lämmitettiin kotona esimerkiksi kattilassa (47 %), mikroaaltouunissa (39 %) tai tuttipullon lämmittimessä (15 %), mutta vain 22 % vanhemmista käytti yli 70 °C vettä äidinmaidonkorvikkeen valmistukseen. Tutkimuksessa havaittiin, että vain 16 % vanhemmista käytti valmistetut äidinmaidonkorvikkeen neljän tunnin sisällä niiden valmistuksesta (Carletti ja Cattaneo 2008). Kyseisessä tutkimuksessa ei havaittu yhteyttä turvallisen jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen käytön ja vanhempien koulutustaustan, iän, parisuhdestatuksen tai lapsimäärän välillä. Myöskään lapsen syntymäpaino (esim. keskoset) tai ikä ei ollut yhteydessä vanhempien äidinmaidonkorvike valmistustapoihin (Carletti ja Cattaneo 2008).

### 5.1.4 Jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeen riskiominaisuudet

WHO on luokitellut *Cronobacter spp.* ja *Salmonella enterica* -bakteerit luokkaan, jolla on todettu selkeää näyttöä mikro-organismien taudinaiheutuskyvystä jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeiden välityksellä (FAO ja WHO 2004). WHO korostaa, että äidinmaidonkorvike ei ole steriili valmiste, vaan se voi sisältää mikro-organismeja, joten kuluttajien ja erityisesti riskiryhmien ruokinnan kanssa toimivien ammattilaisten tulisi ymmärtää äidinmaidonkorvikkeeseen liittyvät riskit. Kronobakteerit ovat erityisesti jauhemaisten elintarvikkeiden ongelmia, sillä ne kestävät hyvin kuivuutta ja osmoottista stressiä. Kronobakteerien on todettu säilyvän jopa kaksi vuotta jauhemaaisessa äidinmaidonkorvikkeessa (Barron ja Forsythe 2007). Beuchat ym. (2009) suorittamassa tutkimuksessa *C. sakazakiin* säilymistä 12 kuukauden säilytyksessä edisti matala  $a_w$ -arvo ( $a_w$  0,25-0,30), kun taas kosteammassa jauheessa, jonka  $a_w$  oli 0,69-0,82, bakteeri säilyi huonommin. Kronobakteerit pystyvät kasvamaan valmistetussa äidinmaidonkorvikkeessa 6-48 °C lämpötilavälillä (Fang ym. 2012). Fang ym. (2012) vertailivat tutkimuksessaan lämpökäsiteltyjen ja ei lämpökäsiteltyjen *C. sakazakii* bakteerien kasvua. Tutkimuksessa havaittiin, että *C. sakazakii* kasvoi hyvin lämpötilavälillä 10-48 °C ja lämpökäsittelemättömillä bakteereilla ei havaittu ollenkaan kasvun viivevaihetta (eng. lag phase), kun taas lämpöaurioituneilla bakteereilla havaittiin kasvun viivevaihe, joka oli keskimäärin vain 0,4 tuntia lämpötilavälillä 25-48 °C (Fang ym. 2012).

Kronobakteerien riskitekijöitä on niiden laaja levinneisyys ympäristöön ja niiden kyky muodostaa biofilmejä elintarviketuotantotiloihin ja -laitteisiin (Iversen ym. 2004, Sani ja Odeyemi 2015). Kronobakteerit pystyvät muodostamaan biofilmiä ja kiinnittymään erilaisille pinnoille, kuten teräs-, silikoni-, lateksi-, ja polykarbonaattipinnoille (Iversen ym. 2004). Lämpötilalla on merkittävä rooli kronobakteerien biofilmin muodostukseen ja kiinnittymiseen, joten tuotanto-olosuhteissa tulee huolehtia riittävän alhaisista lämpötiloista (Kim ym. 2006). Kim ym. (2006) tutkimuksessa biofilmiä ei muodostunut alle 12 °C lämpötilassa ja 25 °C lämpötilassa suurempi määrä bakteereita pystyi kiinnittymään pintoihin kuin 12 °C lämpötilassa. Kronobakteerien muodostamilla biofilmeillä on todettu lisääntyntä vastustuskykyä desinfiointiaineille (Beuchat ym. 2009). Tämä lisää tehokkaan ja oikeanlaisen puhdistuksen ja siivouksen tärkeyttä niin tuotantotiloissa, kuin kotikeittiöissä (Beuchat ym. 2009). Siivousvälineiden oikeaoppinen puhdistus on erityisen tärkeää maitojauhetehtaissa mikro-organismien levittämisen välttämiseksi (Mullane ym. 2008).



Jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen valmistuksessa aerosolit voivat kontaminoida lopputuotteen kronobakteerilla sen kuumennuksen jälkeen. Aerosoleja syntyy esimerkiksi raaka-aineiden käsittelystä, tuotteen kuivaus- ja jauhamisprosesseissa sekä elintarvikehuoneiston siivouksesta (Mullane ym. 2008). Siivouksen yhteydessä voi syntyä aerosoleja esimerkiksi vesiroiskeiden seurauksena, mekaanisen pyyhkimisen aiheuttamana tai pölynimurien pölyttämänä (Mullane ym. 2008, Molloy ym. 2009). Mullane ym. (2008) toteaa myös, että imuroiminen puhtaissa tuotantotiloissa on riski ja korostaa, että tämän riskin pienentämiseksi tulee imureihin valita oikeanlaiset suodattimet, mikäli niitä käytetään. Molloy ym. (2009) puolestaan esittää, että imurointia elintarviketehtaiden puhtaissa tuotantotiloissa tulisi kokonaan välttää, sillä se voi pölyttää bakteeria tuotantotilan ilmaan ja näin lisätä ristikontaminaation riskiä.

Mullane ym. (2008) tutki maitojauheproteiinitehtaan ilmansuodattimien mikrobikontaminaatiota ja mahdollista yhteyttä kronobakteerikontaminaatioon lopputuotteessa. Tutkimuksessa todettiin kronobakteereita jokaisesta tutkitusta ilmansuodattimesta, jotka oli kerätty eri puolilta tehdasta. Mullane ym. (2008) tutkimuksen mukaan kronobakteerien löytyminen jokaisesta ilmansuodattimesta viittaa tehdasilman toistuvaan kontaminaatioon bakteerilla tai bakteerin lisääntymiseen ilmansuodattimien pinnoilla tai molempiin. Kosteuden ja veden kertyminen tehtaan rakenteisiin ja laitteisiin lisää riskiä kronobakteerikontaminaatiolle, joten paikkoja joihin kosteus tiivistyy, kuten jäähdytyskäämien pintoja, tulee tarkkailla ja desinfioida säännöllisesti (Mullane ym. 2008). Mullane ym. (2008) korostaa, että ilmansuodattimien oikeaoppinen asentaminen, huolto, vaihtaminen sekä näytteidenotto ilmansuodattimista on erityisen tärkeää, jotta haitallisten mikro-organismien pääsyä lopputuotteeseen voidaan hillitä.

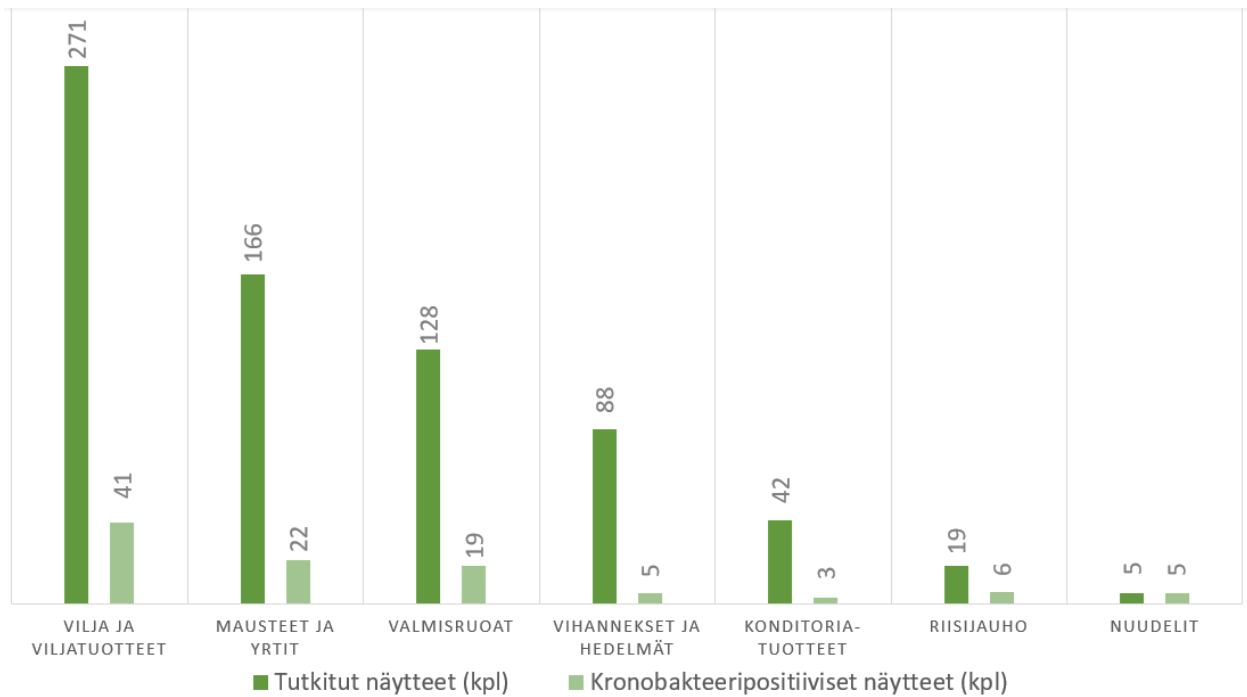
Koska kronobakteerit eivät selviä pastöroinnista, ovat lopputuotteen bakteerit peräisin tuotantoympäristöstä kontaminaationa, äidinmaitokorvikkeen sekoituksesta kotona tai korvikkeeseen tehtaassa lisättävistä lisäaineista, jotka eivät kestä kuumennusta (Kandhai ym. 2004). Pei ym (2019) tutkimuksessa todettiin, että raakamaito ei ollut merkittävä kronobakteerien lähde, vaan he pitivät tärkeimpänä kontaminaatoriskinä elintarvikkeiden valmistuksessa muita jauhemaisia raaka-aineita, joita lisätään äidinmaidonkorvikkeeseen. WHO toteaa, että jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen valmistuksessa juotavaksi yli 70 °C veden käyttö vähentää niin merkittävästi elävien bakteerien määrää, että se sallii jopa

valmisteen nauttimisen hitaasti huoneenlämmössä (kahden tunnin sisällä valmistuksesta) sekä ilmastossa, jossa on korkea lämpötila (jopa 35 °C) ja myös kehittyvissä maissa, joissa ei välttämättä ole käytettävissä jääkaappia tuotteen varastointiin (FAO ja WHO 2004). Äidinmaidonkorvikkeen valmistuksessa on siis tärkeää sekä välttää valmisteen kontaminaatiota elintarviketuotannossa että huolehtia tuotteen oikeaoppisesta valmistuksesta kotona ja sairaalaolosuhteissa.

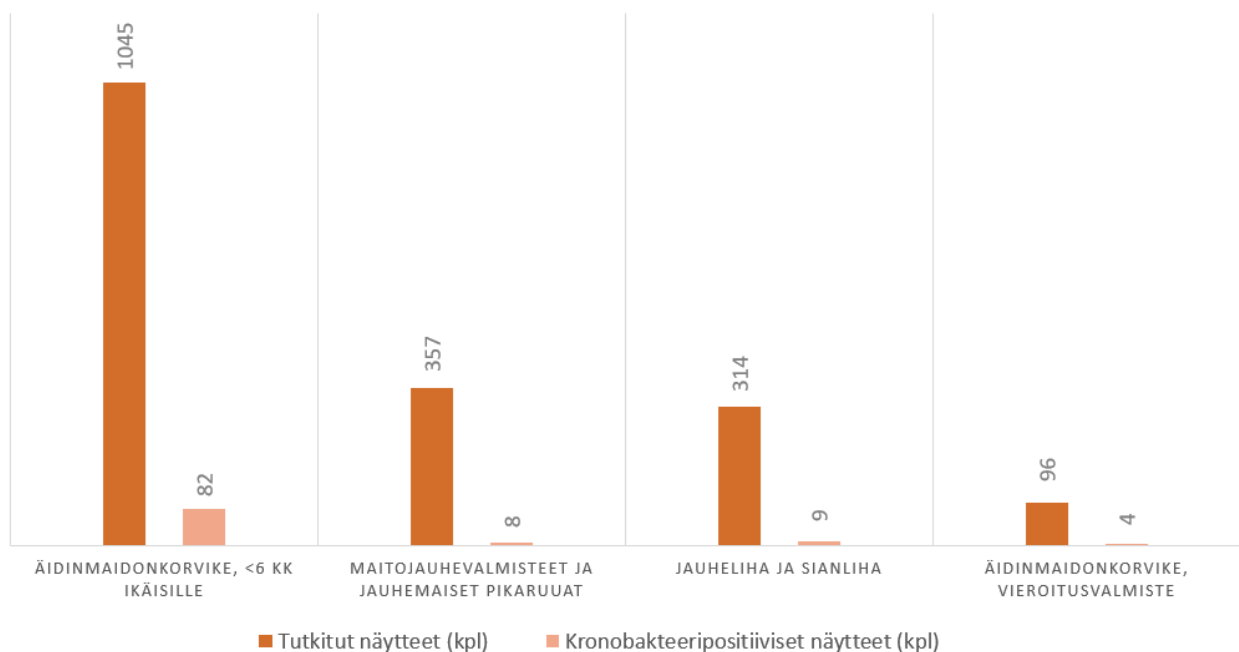
Euroopan unionin raportissa zoonooseista, niiden aiheuttajista ja elintarvikevälitteisistä tautitapauksista (The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks) on koottu jäsenmaiden tietoja *C. sakazakiin* osalta äidinmaidonkorvikkeista, lääkinnällisiin tarkoituksiin tarkoitetuista ruoista sekä vähittäismyynnistä että tehdastasolta. Vuonna 2015 EU:n alueella otettiin 12 jäsenvaltiosta yhteensä 1591 näytettä vastasyntyneiden äidinmaidonkorvikkeista ja lääkinnällisiin tarkoituksiin tarkoitetuista ruoista ja jäsenvaltioista Belgia sekä Slovakia raportoivat molemmat yhden *C. sakazakii* positiivisen näytteen (EFSA ja ECDC 2016). Vuosina 2016 ja 2017 raportoitiin vain yksi positiivinen näyte per vuosi: vuonna 2016 Slovakiasta ja vuonna 2017 Tškeissä (EFSA ja ECDC 2017, EFSA ja ECDC 2018). Vuonna 2017 raportoitiin kuitenkin yhteensä 16 kappaletta *C. sakazakii* positiivisia näytteitä näiden tuotteiden jalostuslaitoksista Irlannista, Alankomaista ja Tškeistä (EFSA ja ECDC 2018).

## 5.2 Muut elintarvikkeet

Kronobakteereita on todettu useista muistakin elintarvikkeista, kuin maitojauheista (Sani ja Odeyemi 2015). Bakteeria on tutkittu esimerkiksi eläinperäisistä tuotteista, kuten valmisruuista, jauhe- ja sianlihasta, sekä kasviperäisistä tuotteista, kuten yrteistä, mausteista, vihanneksista, hedelmistä, nuudeleista, riisijauhosta, viljoista ja viljatuotteista (kuva 2 ja 3) (Sani ja Odeyemi 2015). Sanin ja Odeyemin (2015) meta-analyysissä todettiin, että kronobakteerien prevalenssi oli suurempi kasviperäisissä näytteissä (20,1 %), kuin eläinperäisissä näytteissä (8 %). Sani ja Odeyemi (2015) toteavat kuitenkin, että kronobakteerien esiintyminen kasviperäisissä tuotteissa vaatii lisää tutkimusta, jotta ymmärrettäisiin tarkemmin bakteerin reservuaarista luonnossa ja bakteerin kontaminaatioreiteistä elintarvikkeisiin.



**Kuva 2.** Ei-eläinperäisiä elintarvikenäytteitä vuosilta 2008-2014 ja niiden kronobakteeriposiitivisten näytteiden määrä Sanin ja Odeyemin (2015) meta-analyysin pohjalta.



**Kuva 3.** Eläinperäisiä elintarvikenäytteitä vuosilta 2008-2014 ja niiden kronobakteeriposiitivisten näytteiden määrä Sanin ja Odeyemi (2015) meta-analyysin pohjalta.

Euroopan Unionin yhteenvetoraportissa on koottu jäsenmaiden tietoja *C. sakazakiin* osalta myös muista tutkituista elintarvikkeista, kuin äidinmaidonkorvikkeista ja lääkinnällisiin tarkoituksiin tarkoitetuista ruoista. Viime vuosina on tutkittu elintarvikkeita niin vähittäismyynnistä kuin elintarvikelaitoksista. Muista elintarvikkeista tutkittiin vuonna 2015 EU:n jäsenvaltioista Tšekeissä, Italiassa ja Slovakiassa yhteensä 600 näytettä, joista Tšekeissä raportoitettiin 41 kappaletta *C. sakazakii* -positiivista näytettä maito- ja herajauhenäytteistä (EFSA ja ECDC 2016). Vuonna 2016 tutkittiin yhteensä 61 näytettä Tšekeissä ja Irlannissa, joista Tšekeistä raportoitettiin 10 positiivista näytettä maidosta ja herajauheesta (EFSA ja ECDC 2017). Vuonna 2017 vähittäismyynnissä olleista elintarvikkeista tutkittiin Itävallasta ja Espanjasta yhteensä 40 näytettä, joista ei havaittu yhtään positiivista näytettä. Vuonna 2017 tutkittiin myös maitotuotteiden jalostuslaitoksista, pois lukien juustotuotteiden valmistuslaitokset, Tšekeissä ja Irlannissa yhteensä 126 näytettä, joista Tšekeissä löydettiin 38 kappaletta *C. sakazakii* positiivista näytettä (EFSA ja ECDC 2018).

### 5.3 Kronobakteerit ympäristössä

Kronobakteerien esiintymistä ympäristössä on tutkittu monissa tutkimuksissa ja bakteeria on löydetty muun muassa maitojauhetehtaiden, muiden elintarviketehtaiden, teurastamoiden, tuotantoeläintilojen ja kotitalouksien ympäristönäytteistä (Kandhai ym. 2004, Molloy ym. 2009). Ympäristönäytteiden avulla pyritään selvittämään ja paikantamaan kronobakteerien mahdollisia kontaminaatioreittejä riskielintarvikkeisiin. Elintarvikehuoneistojen ja erityisesti äidinmaidonkorviketta valmistavien laitosten ympäristönäytteitä on tutkittu ahkerasti. Vuonna 2004 tehdyssä tutkimuksessa otettiin ympäristönäytteitä neljältä eri maitojauhetehtaalta ja tulokseksi saatiin, että näytteistä noin 20 % oli positiivisia kronobakteerien suhteen (Kandhai ym. 2004). Näytteet oli kerätty tehtaalta tuotantolinjaston ympäriltä, tuotantotilan pinnoilta sekä tuotantotilan imurin pölypussista ja positiivisia näytteitä löytyi tasaisesti kaikista tutkituista kohteista (Kandhai 2004). Vuosina 2013-2014 Kiinassa suoritettiin laaja valtakunnallinen tutkimus, jolla pyrittiin kartoittamaan Kiinan äidinmaidonkorviketehtaiden ympäristöä ja tuotantotiloja (Pei ym. 2019). Tutkimuksen taustalla oli havainto, että Kiinassa markkinoilla olevat äidinmaidonkorvikkeet sekä vieroitusvalmisteet olivat merkittävästi useammin kontaminoituneita kronobakteereilla, kuin vastaavissa tutkimuksissa muualla maailmassa (Pan ym. 2014). Vuosina 2013-2014 otetuissa äidinmaitokorviketehtaiden ympäristönäytteissä Pei ym. (2019) totesivat, että kronobakteereita löydettiin muun muassa tehtaiden liukuihnilta, seinistä, lattioilta, imureiden pölypusseista ja maitojauheesta, jota oli tippunut linjaston

ulkopuolelle. Kyseisessä tutkimuksessa tutkittiin kahdeksalta äidinmaitokorviketehtaalta yhteensä 4790 ympäristönäytettä, joista 0,35 % eristettiin kronobakteeri (Pei ym. 2019). Reich ym. (2010) selvittivät puolestaan tutkimuksessaan saksalaista äidinmaitokorviketehdasta ja sai tulokseksi, että 28 % äidinmaitokorviketehtaiden pölynimurien pölynäytteistä oli positiivisia kronobakteerien suhteen. Muistakin elintarvikelaitoksista, kuten vilja-, perunajauho-, pasta- ja suklaatehtaista, on todettu ympäristönäytteistä kronobakteereja (Kandhai ym. 2004).

Eviran (nyk. Ruokavirasto) ohjeen 10501/2 liitteen 3 prosessihygieniavaatimuksien mukaan elintarvikelaitosten, jotka valmistavat äidinmaidonkorviketta tai lääkinnällisiin tarkoituksiin käytettäviä jauhemaisia elintarvikkeita, jotka on tarkoitettu alle 6 kk ikäisille lapsille, on seurattava enterobakteerien esiintymistä tuotantoympäristössä ja -laitteissa. Prosessihygieniavaatimuksessa todetaan, että enterobakteerien löytyminen voi olla yhteydessä kronobakteerien esiintymiseen, joten elintarvikelaitosten tulee suorittaa rinnakkain sekä enterobakteeri- että kronobakteeritestejä. Yksittäinen elintarvikelaitos voi kuitenkin suorittaa pelkkää enterobakteerinäytteenottoa, ja jos enterobakteereita todetaan näytteissä, on kyseisen laitoksen tutkittava erät myös kronobakteerien varalta. Tällöin kyseisen laitoksen on kuitenkin pystyttävä todistamaan kyseisessä laitoksessa havaittu yhteys entero- ja kronobakteerien välillä. Prosessihygieniavaatimukset määrittävät, että enterobakteereita ei saa esiintyä yhdessäkään 10 gramman osanäytteessä valmistusprosessin lopussa. Näytteitä suositellaan otettavaksi tuotantoympäristöstä ja -laitteista 16-24 kertaa vuodessa ja vertailumenetelmänä käytetään standardia ISO 21528-1:2017. (ISO 22964:2017)

Molloy ym. (2009) tutki kronobakteerien esiintymistä tuotantoeläimissä, niiden kasvatusympäristössä ja teurastamoilla. Tutkimuksessa todettiin, että tuotantoeläimet eivät toimineet kronobakteerien lähteenä, mutta muun muassa nautojen rehusta eristettiin kronobakteeria. Teurastamoilta otetuista naudan- ja sianlihanäytteissä löydettiin kronobakteeria ja sitä löytyi muun muassa nautateurastamon ilmanäytteestä (Molloy ym. 2009). Teurastamoilta otettujen näytteiden perusteella Molloy ym. (2009) toteaa, että teurastamon tilojen ilma ja välineistö olivat kontaminoituneet kronobakteereilla, sillä tuotantoeläimistä otetut näytteet olivat negatiivisia, mutta teurastamolla käsitellyn lihan näytteet positiivisia.

Kronobakteereita esiintyy myös ihmisten kotikeittiöissä, minkä vuoksi on mahdollista, että jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen valmistuksen yhteydessä kronobakteerit kontaminoivat valmisteen (Kandhai ym. 2004, Molloy ym. 2009). Esimerkiksi Molloy ym. (2009) tutkivat

näytteitä sekä kotitalouksien keittiöiden työtasoilta että pölynimurin pölystä. Pölynimurin pölynäytteistä löydettiin kyseisessä tutkimuksessa kronobakteereita. Kotitalouksien mahdollisia kronobakteerilähteitä ovat esimerkiksi muut elintarvikkeet, joiden mukana bakteeri leviää kotiympäristöön ja esimerkiksi keittiötasoilla olevaan pölyyn (Molloy ym. 2009). Jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeen käsittelyssä kotikeittiössä tulee noudattaa WHO:n tarkkoja ohjeita hygieenisestä valmistuksesta ja valmistusvälineiden steriloimisesta, jotta kontaminaatoriski olisi mahdollisimman pieni.

Jauhemaista äidinmaidonkorviketta käytetään kotitalouksien lisäksi myös esimerkiksi sairaaloissa ja päiväkodeissa. Näissä äidinmaidonkorvike saatetaan valmistaa usein isoissa erissä etukäteen, mikä voi lisätä kronobakteerien aiheuttamaa riskiä korvikkeessa (WHO ja FAO 2007). Ammattihenkilökunnan koulutus, puhdas ja erillinen äidinmaidonkorvikkeen valmistustila sekä tuttipullojen ja valmistusvälineiden sterilointi ovat erityisen tärkeitä hyvän hygieenisen äidinmaidonkorvikkeen valmistuksessa sairaaloissa ja päiväkodeissa (WHO ja FAO 2007). WHO korostaa, että sairaaloissa ja päiväkodeissa tulisi olla selkeät kirjalliset ohjeet oikeaoppiseen jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeen valmisteluun ja säilytykseen, ohjeiden noudattamista tulisi valvoa ja henkilökunnan tietoisuutta riskeistä ylläpitää. Koska kronobakteerit pystyvät kiinnittymään ja muodostamaan biofilmiä erilaisiin pintoihin, kuten vauvojen syöttövälineisiin, tulee näiden puhdistamiseen ja sterilointiin kiinnittää erityistä huomiota, jotta bakteeri ei jää pysyväksi kontaminaatiolähteeksi näihin välineisiin (Iversen ym. 2004). Sairaalaolosuhteissa on erityisen tärkeää, että äidinmaidonkorvike ei kontaminoidu, sillä siellä hoidetaan jopa suuria määriä vastustuskyvyltään heikkoja riskiryhmän potilaita. WHO ohjeistaakin, että sairaaloissa tulisi käyttää riskiryhmillä jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeen sijasta steriiliä nestemäistä valmistetta, mikäli sen käyttö on mahdollista (FAO ja WHO 2007).

Sairaalaolosuhteissa ruokintaletkun käytön on todettu olevan potentiaalinen riski kronobakteeri-infektion kannalta (Hurrell ym. 2009). Ruokintaletkuja käytetään tehohoidossa muun muassa riskiryhmiin kuuluvilla vauvoilla. Ruokintaletkun materiaalina käytetään esimerkiksi polyvinyylikoridia tai polyuretaania ja ruokintaletku on ruumiinlämmössä paikallaan jopa 48 tuntia (Hurrell ym. 2009). Hurrell ym. (2009) havaitsivat tutkimuksessaan, että kronobakteerit pystyvät kiinnittymään ruokintaletkun pintaan ja näin kontaminoimaan aina seuraavat ruokinta-annokset. McMullan ym. (2018) raportoivat keskosesta, joka kuoli sairaalassa *C. sakazakiin* aiheuttamaan aivokalvontulehdukseen ja verenmyrkytykseen. Sairastunut vauva oli saanut ruokintaletkun kautta ainoastaan lypsettyä äidin rintamaitoa, mutta

maito oli kerätty kannettavalla, mutta sterilioimattomalla, rintapumpulla. Äidin rintamaidosta ei löytynyt kronobakteereita, joten tutkijat pitävät todennäköisenä, että käytetty rintapumppu toimi kronobakteerin kontaminaatiolähteenä (McMullan ym. 2018). Lypsetyn rintamaidon käytön riskit keskosille eivät ole niin tunnettuja, kuin jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen käytön riskit. McMullan ym. (2018) korostavatkin hygienian tärkeyttä myös rintapumppujen käytössä sekä lypsetyn rintamaidon oikeanlaista säilytystä, jotta se ei kontaminoidu taudinaiheuttajilla.

## 6. POHDINTA

Tieto kronobakteereista ja niiden ominaisuuksista sekä kronobakteereihin liittyvät tutkimukset ovat lisääntyneet selvästi viime vuosikymmenellä, mutta silti tietomme kyseisestä bakteerisuvusta on vajavaista. Kirjallisuuskatsaukseen kronobakteereista löytyy kirjoittamisen hetkellä paljon koontiartikkeleita, mutta alkuperäistutkimukset, joihin artikkeleissa viitataan ovat usein ajalta, jolloin *Cronobacter* spp. oli vielä tunnettu yhtenä bakteerilajina, *Enterobacter sakazakiina*. Eri kronobakteerilajien välisiä eroja ja ominaisuuksia ei vielääkään tunneta tarkasti. Kronobakteereita koskevan tiedon analysointia vaikeuttaa myös se, että vanhemmissa tutkimuksissa käytetyt kronobakteerien osoitusmenetelmät on myöhemmin todettu epäluotettaviksi (Iversen ym. 2008a). Kronobakteerilajien ekologian ja virulenssin tuntemiseen tarvitaan selvästi vielä lisää tutkimusta, mikä onnistunee tehokkaammin nykypäivän kehittyneiden ja nopeutuneiden laboratoriotutkimusmenetelmien avulla. Lisätutkimusta kaivataan bakteerin reservuaareista ja kontaminaatioreiteistä elintarvikkeisiin sekä kotitalouksissa, sairaaloissa että elintarvikelaitoksissa.

Huoli kronobakteerien aiheuttamista kuolemantapauksista ja vakavista sairauksista lisää merkittävästi lisätutkimustiedon tarvetta. Vaikka kronobakteerit ovat harvinaisia taudinaiheuttajia niin vastasyntyneillä kuin aikuisillakin (Bowen ja Braden 2006), ovat kronobakteerien aiheuttamat taudit, kuten aivokalvontulehdus, verenmyrkytys ja kuolioinen suolistotulehdus, varsinkin vastasyntyneillä todella vakavia ja kuolleisuus voi olla korkea (Friedemann 2009). Tämä tekee kronobakteereista julkisen terveydenhuollon kannalta vakavan huolenaiheen. Kronobakteerien aiheuttamien, jauhemaiseen äidinmaidonkorvikkeeseen yhdistettyjen, taudinpurkausten ohella WHO toteaa, että kronobakteeritapauksia raportoidaan todennäköisesti vähemmän, kuin mitä niitä tosiasiasa esiintyy (WHO ja FAO 2007). Kronobakteerien kliininen merkitys vaatii lisätutkimusta niin vastasyntyneillä kuin aikuisillakin. Viimevuosina lisääntyneet raportoinnit aikuisten kronobakteeri-infektioista (Lepuschitz ym. 2019), kertovat todennäköisesti paremmasta kronobakteeri-infektioiden tunnistamisesta sekä tehokkaammista kronobakteerien osoitusmenetelmistä laboratorioissa.

Jauhemaisia äidinmaidonkorvikkeita valmistavien laitosten tietoisuus kronobakteereista ja niiden riskitekijöistä on avainasemassa kronobakteerien aiheuttamien vaarojen minimoimisessa valmiissa tuotteissa. Laitosten tehokas riskinhallinta perustuu mahdollisten kronobakteerien kontaminaatiolähteiden tuntemiseen koko tuotteen valmistusprosessin ja elinkaaren osalta



(Reich ym. 2010, Pei ym. 2019). Jauhmainen äidinmaidonkorvike ei ole steriili valmiste, mutta lainsäädäntö edellyttää, että maitojauheita tutkitaan systemaattisesti ja missään erässä ei saa olla osoitettavissa kronobakteereita (EKa 2073/2005, EKa 365/2010). Kronobakteerien pääsy tuotantotiloihin esimerkiksi raaka-aineiden välityksellä tulee estää ja kronobakteerien tarttumista ja kasvamista tuotantotilojen pinnoilla tulee välttää. Äidinmaitojauheen onnistuneesta pastöroinnista ja steriloinnista tulee huolehtia ja olla erityisen varovainen lämpökäsittelyn jälkeen lisättävien ainesosien turvallisuuden kanssa.

Kotitalouksissa tapahtuvan jauhemaisen äidinmaidonkorvikkeen käytön merkitys on suuri kronobakteeririskin kannalta (Kandhai ym. 2004, Molloy ym. 2009). Äidinmaidonkorvikkeiden käytön suosio ympäri maailmaa, yhdistettynä heikkoon tietouteen siihen liittyvistä riskeistä ja niiden minimoimisesta valmistuskäytäntöjen avulla (Carletti ja Cattaneo 2008), sekä kronobakteerien yleinen esiintyminen kotitalouksien keittiöissä (Kandhai ym. 2004, Molloy ym. 2009), ovat hankala yhdistelmä. WHO:n ohjeistukset ja tiedotteet ovat selkeitä ja korostavat hygieniaa, sekä yli 70 °C veden käyttöä äidinmaidonkorvikkeiden käytössä. Käytännössä vanhempien tietoisuus ja käytännöt arkielämässä äidinmaidonkorvikkeiden käytöstä eivät ole riittäviä, jotta kronobakteerien aiheuttamaa riskiä ei olisi (Carletti ja Cattaneo 2008). Jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeiden turvallisen käytön neuvontaa on selvästi parannettava.

Äidinmaidonkorvikkeita valmistavien laitosten vastuulla on huolehtia tuotteiden pakkausselosteiden ohjeistavan kuluttajia turvalliseen äidinmaidonkorvikkeen käyttöön. WHO:n ohjeistus yli 70 °C veden käytöstä äidinmaidonkorvikkeen valmistuksessa vähentää kronobakteerien aiheuttamaa riskiä merkittävästi (WHO ja FAO 2007), mutta silti on todettu, että markkinoilla olevissa jauhemaisissa äidinmaidonkorvikkeissa pakkausselosteet ohjeistavat kuluttajia epämääräisesti suositellusta lämpötilasta (Chap ym. 2009). Nämä ristiriidat ohjeistuksissa vaikeuttavat kuluttajien turvallista äidinmaidonkorvikkeen käyttöä. Yleensä pakkausselosteen ohje on lähin saatavilla oleva ohjeistus äidinmaidonkorvikkeen käytön hetkellä. Jauhemaisia äidinmaidonkorvikkeita valmistavien yritysten tulisi huomioida WHO:n ohjeistus ja ohjeistuksen takana olevien tutkimusten tulokset, jotta kronobakteerien aiheuttamaa riskiä voitaisiin yhä pienentää.

Jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeen käyttö sairaalaolosuhteissa esimerkiksi vastasyntyneiden teho-osastoilla on erityisen riskialtista, ja suurimmassa riskissä olevien vastasyntyneiden kohdalla suositellaankin käytettäväksi kaupallista steriiliä äidinmaidonkorvikevalmistetta perinteisten jauhemaisten sekoitettavien korvikkeiden sijaan (FAO ja WHO 2007). Ruokintaletkujen käyttöön liittyy riski persistoivan kronobakteerilähteen muodostumisesta, ja tämä pitää ottaa huomioon, erityisesti siksi, että ruokintaletkuja tarvitsevat vastasyntyneet ovat todennäköisesti muutenkin kronobakteeri-infektion riskipotilaita (Hurrell ym. 2009). Sairaalahenkilökunnan koulutus ja jauhemaisten äidinmaidonkorvikkeiden valmistusvälineiden ja -tapojen säännöllinen tarkastus on tärkeää. Sairaalahenkilökunnalla on myös vastuu vanhempien koulutuksessa oikeanlaiseen äidinmaidonkorvikkeiden käyttöön ja valmistukseen kotiolosuhteissa. Aikuisilla kronobakteeri-infektiot ovat yleisimmin nosokomiaalisia eli sairaalasta peräisin olevia infektioita (Lai 2001). Kronobakteerin lähde sairaaloissa vaatii lisätutkimusta.

## **8. Kiitokset**

Suuri kiitos ohjaajilleni Elina Säteelle ja Riikka Keto-Timoselle mukavasta ja sujuvasta yhteistyöstä. Haluan kiittää myös työni tarkastajaa Hanna Castroa. Kiitos ja kumarrus Jussa-Pekka Virtaselle teknisestä ja henkisestä tuesta. Iso kiitos myös opponentilleni Nea Aminoffille kirjastolla vietetyistä tunteista sekä Mytylle aivojeni tuulettamisesta kirjoitusprojektin lomassa.

## 7. LÄHTEET

Barron JC, Forsythe SJ. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *J Food Protect* 2007, 70:2111-2117. doi: 10.4315/0362-028x-70.9.2111.

Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, Lin LC, Ryu JH, Richards GM. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int J Food Microbiol* 2009, 136:204-213. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029.

Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrímsson O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol* 1989, 27:2054-2056.

Block C, Peleg O, Minster N, Bar-Oz B, Simhon A, Arad I, Shapiro M. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002, 21:613-616. doi: 10.1007/s10096-002-0774-5.

Bowen A, Braden CR. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis* 2006, 12:1185. doi: 10.3201/eid1208.051509.

Bowen A, Wiesenfeld HC, Kloesz JL, Pasculle AW, Nowalk AJ, Brink L, Elliot E, Martin H, Tarr CL. Notes from the field: *Cronobacter sakazakii* infection associated with feeding extrinsically contaminated expressed human milk to a premature infant -- Pennsylvania, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017, 66:761-762. doi: 10.15585/mmwr.mm6628a5.

Carletti C, Cattaneo A. Home preparation of powdered infant formula: is it safe? *Acta Paediatr* 2008, 97:1131-1132. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.00846.x.

Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J, Osaili T, Shaker R, Jaradat Z, Hartantyo SHP, Abdullah Sani N, Estuningsih S, Forsythe SJ. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol* 2009, 136:185-188. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.005.

Codex Alimentarius. Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children. CAC/RCP 66, 2008.

[http://www.fao.org/input/download/standards/11026/CXP\\_066e.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/11026/CXP_066e.pdf) , haettu 22.2.2020.

Coignard B, Vaillant V, Vincent JP, Leflèche A, Mariani-Kurkdjian P, Bernet C, L'héritau F, Sénéchal H, Grimont P, Bingen E, Desenclos JC. Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons, France, octobre-décembre 2004. *Sante Publique* 2006, 10-13.

Corti G, Panunzi I, Losco M, Buzzi R. Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man. *J Chemotherapy* 2007, 19:94-96. doi: 10.1179/joc.2007.19.1.94.

De Benito A, Gnanou Besse N, Desforges I, Gerten B, Ruiz B, Tomás D. Validation of standard method EN ISO 22964:2017 — Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. *Int J Food Microbiol* 2019, 288:47-52. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.025.

Druggan P, Iversen C. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. *International journal of food microbiology* 2009, 136:169-178.

EKa 2073/2005. Euroopan komission asetus (EY) N:o 2073/2005, annettu 15 päivänä marraskuuta 2005, elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista. Euroopan unionin virallinen lehti L 338/1. 22.12.2005.

<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:FI:PDF>, haettu 22.2.2020.

EKa 365/2010. Euroopan komission asetus (EU) N:o 365/2010, annettu 28 päivänä huhtikuuta 2010, elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista annetun asetuksen (EY) N:o 2073/2005 muuttamisesta siltä osin kuin on kyse enterobakteerien esiintymisestä pastöroidussa maidossa ja muissa pastöroiduissa nestemäisissä maitotuotteissa sekä *Listeria monocytogenes* -bakteerin esiintymisestä elintarvikekäyttöön tarkoitettussa suolassa. Euroopan unionin virallinen lehti L 107/9,29.4.2010.

<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:107:0009:0011:FI:PDF>, haettu 22.2.2020

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J* 2016, 14(12):4634. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J* 2017, 15(12):5077. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5077

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J* 2018, 16(12):5500. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500

Evira (nyk. Ruokavirasto). Eviran ohje 10501/2: Ohje elintarvikealan toimijoille. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset. 2017.

Fang T, Gurtler JB, Huang L. Growth kinetics and model comparison of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula. *Journal of Food Science* 2012, 77:E247-E255. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02873.x.

FAO, WHO. Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula. Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series, No. 6. Geneva, Switzerland, 2004.

FAO, WHO. Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series, No. 10. Rome, Italy, 2006.

Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. *Enterobacter sakazakii*: A new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 1980, 30:569-584. doi: 10.1099/00207713-30-3-569.

Fernandez-Baca V, Ballesteros F, Hervas JA, Villalon P, Dominguez MA, Benedi VJ, Alberti S. Molecular epidemiological typing of *Enterobacter cloacae* isolates from a neonatal intensive care unit: three-year prospective study. *J Hosp Infect* 2001, 49:173-182. doi: 10.1053/jhin.2001.1053.

Franco AA, Kothary MH, Gopinath G, Jarvis KG, Grim CJ, Hu L, Datta AR, Mccardell BA, Tall BD. Cpa, the outer membrane protease of *Cronobacter sakazakii*, activates plasminogen and mediates resistance to serum bactericidal activity. *Infect Immun* 2011, 79:1578-1587. doi: 10.1128/iai.01165-10.

Friedemann M. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009, 28:1297-1304. doi: 10.1007/s10096-009-0779-4.

Gaschignard J, Levy C, Romain O, Cohen R, Bingen E, Aujard Y, Boileau P. Neonatal bacterial meningitis: 444 Cases in 7 Years. *Pediatr Infect Dis J* 2011, 30:212-217. doi: 10.1097/inf.0b013e3181fab1e7.

Graves R. The Greek Myths. 1. p. Penguin Books, London, UK 1992.

Grim CJ, Kothary MH, Gopinath G, Jarvis KG, Beaubrun JJ, McClelland M, Tall BD, Franco AA. Identification and characterization of *Cronobacter* iron acquisition systems. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78:6035-6050. doi: 10.1128/aem.01457-12.

Guo M. Introduction: trends and issues in breastfeeding and the use of infant formula. Teoksessa: Guo M (toim.) Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology. p. Woodhead Publishing, 2014. 1-16.

Henry MCW, Moss RL. Necrotizing enterocolitis. *Annu Rev Med* 2009, 60:111-124. doi: 10.1146/annurev.med.60.050207.092824.

Himelright I, Harris E, Lorch V, Anderson M, Jones T, Craig A, Kuehnert M, Forster T, Arduino M, Jensen B, Jernigan D. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula --Tennessee, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002, 51:297-300.

Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Forsythe SJ. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *Int J Food Microbiol* 2009, 136:227-231. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.007.

International Standard. ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. Geneva, Switzerland. 2017.

Iversen C, Druggan P. Culture media for isolating *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*). Teoksessa: Corry J, Curtis G, Baird R (toim.) Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. 3. p. The Royal Society of Chemistry, 2012. 357-376.

Iversen C, Druggan P, Schumacher S, Lehner A, Feer C, Gschwend K, Joosten H, Stephan R. Development of a novel screening method for the isolation of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl Environ Microbiol* 2008a, 74:2550-2553.

Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Tech* 2003, 14:443-454. doi: 10.1016/S0924-2244(03)00155-9.

Iversen C, Lane M, Forsythe S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology* 2004, 38:378-382.

Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. *BMC Evol Biol* 2007a, 7:64. doi: 10.1186/1471-2148-7-64.

Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. Identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J Clin Microbiol* 2007b, 45:3814-3816. doi: 10.1128/jcm.01026-07.

Iversen C, Mullane N, Mccardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, Stephan R, Joosten H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. dublinensis subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. lausannensis subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. lactaridi subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008b, 58:1442-1447. doi: 10.1099/ij.s.0.65577-0.

Joseph S, Sonbol H, Hariri S, Desai P, Mcclelland M, Forsythe SJ. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2012, 50:3031-3039. doi: 10.1128/jcm.00905-12.

Kandhai MC, Reij MW, Gorris LG, Guillaume-Gentil O, Van Schothorst M. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet* 2004, 363:39-40. doi: 10.1016/s0140-6736(03)15169-0.

Kim H, Ryu J-H, Beuchat LR. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72:5846-5856. doi: 10.1128/aem.00654-06.

Kim K, Kim K-P, Choi J, Lim J-A, Lee J, Hwang S, Ryu S. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76:5188-5198. doi: 10.1128/aem.02498-09.

Kothary MH, Mccardell BA, Frazar CD, Deer D, Tall BD. Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73:4142-4151. doi: 10.1128/aem.02729-06.



KTMa 1216/2007. Kauppa- ja teollisuusministeriön asetus äidinmaidonkorvikkeesta ja vierotusvalmisteesta. <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2007/20071216>, haettu 22.2.2020.

Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2001, 80:113-122. doi: 10.1097/00005792-200103000-00004.

Lang E, Iaconelli C, Zoz F, Guyot S, Alvarez-Martin P, Beney L, Perrier-Cornet JM, Gervais P. Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella Typhimurium* in standard buffer and milk. *Food Microbiol* 2017, 62:82-91. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.005.

Lepuschitz S, Ruppitsch W, Pekard-Amenitsch S, Forsythe SJ, Cormican M, Mach RL, Pierard D, Allerberger F. Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans, Europe, 2017. *Emerg Infect Dis* 2019, 25:515-522. doi: 10.3201/eid2503.181652.

Mcmullan R, Menon V, Beukers AG, Jensen SO, Van Hal SJ, Davis R. *Cronobacter sakazakii* infection from expressed breast milk, Australia. *Emerg Infect Dis* 2018, 24:393-394. doi: 10.3201/eid2402.171411.

Mohan Nair MK, Venkitanarayanan K. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. *Pediatric Research* 2007, 62:664-669. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181587864.

Molloy C, Cagney C, O'brien S, Iversen C, Fanning S, Duffy G. Surveillance and characterisation by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int J Food Microbiol* 2009, 136:198-203. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.007.

Monroe PW, Tift WL. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). *J Clin Microbiol* 1979, 10:850-851.

Mullane N, Healy B, Meade J, Whyte P, Wall PG, Fanning S. Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:5913-5917. doi: 10.1128/aem.00745-08.

Muytjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, Kollee LA, Wachsmuth IK, Farmer JJ, 3rd. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol* 1983, 18:115-120.

Okike IO, Johnson AP, Henderson KL, Blackburn RM, Muller-Pebody B, Ladhani SN, Anthony M, Ninis N, Heath PT. Incidence, etiology, and outcome of bacterial meningitis in infants aged < 90 days in the United Kingdom and Republic of Ireland: prospective, enhanced, national population-based surveillance. *Clin Infect Dis* 2014, 59:E150-E157. doi: 10.1093/cid/ciu514.

Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *Journal of food protection* 2003, 66:370-375.

Pan Z, Cui J, Lyu G, Du X, Qin L, Guo Y, Xu B, Li W, Cui Z, Zhao C. Isolation and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula. *Foodborne Pathog Dis* 2014, 11:456-461. doi: 10.1089/fpd.2013.1691.

Pei X, Li Y, Zhang H, Zhan L, Yu X, Lan G, Jia H, Li N, Yang D, Mei L. Surveillance and characterisation of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories. *Food Control* 2019, 96:318-323. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.09.009.

Reich F, König R, Von Wiese W, Klein G. Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. *Int J Food Microbiol* 2010, 140:214-217. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.031.

Sani NA, Odeyemi OA. Occurrence and prevalence of *Cronobacter* spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus* 2015, 4:545. doi: 10.1186/s40064-015-1324-9.

Stephan R, Grim CJ, Gopinath G, Mammel M, Sathyamoorthy V, Trach L, Chase H, Fanning S, Tall B. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014, 64:3402-3410. doi: 10.1099/ijss.0.059832-0.

Tamigniau A, Vanhaecke J, Saegeman V. *Cronobacter sakazakii* bacteremia in a heart transplant patient with polycystic kidney disease. *Transpl Infect Dis* 2015, 17:921-925. doi: 10.1111/tid.12466.

Urmenyi AM, Franklin AW. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1961, 1:313-315. doi: 10.1016/s0140-6736(61)91481-7.

Van Acker J, De Smet F, Muyldermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol* 2001, 39:293-297. doi: 10.1128/jcm.39.1.293-297.2001.

WHO. Guidelines on HIV and infant feeding. Principles and recommendations for infant feeding in the context of HIV and a summary of evidence. Geneva, Switzerland, 2010

WHO, FAO. Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula: guidelines. The Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, WHO, in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Geneva, Switzerland 2007.